

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Antropologie a genetika člověka

Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



**Bc. Tereza Holoubková**

Evulce receptorů hořké chuti PTC v západní Africe  
Evolution of PTC bitter taste receptors in West Africa

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: prof. Mgr. Viktor Černý, Dr.

Praha, 2022

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 20.4.2022

---

Bc. Tereza Holoubková

## **Poděkování**

V první řadě bych ráda poděkovala mému školiteli prof. Mgr. Viktorovi Černému, Dr. za pomoc při vypracování této práce a rovněž i za ochotu a čas, který mé práci věnoval. Zároveň děkuji i konzultantce mé práce Mgr. Ivě Kulichové za cenné rady a pomoc při analýze dat a Mgr. Martině Čížkové, Ph.D. za trpělivost při mém zaučování v laboratoři. Konečně bych také ráda poděkovala rodině a Bc. Kateřině Menhartové za podporu nejen během psaní této práce, ale i po celou dobu mého studia.

## Abstrakt

Tato diplomová práce má za cíl zjistit, zda je gen *TAS2R38* v západní Africe pod vlivem selekce a zda se jeho diverzita nějak liší u populací různých subsistencí v této oblasti. Zároveň se zaměřuje na polymorfismy vyskytující se v tomto genu a na jejich asociaci s vnímáním hořké chuti PTC. Práce zpracovává 147 vzorků slin od tří populací Mauritanie s cílem nasekvenovat DNA pro exon genu *TAS2R38*. Celkem bylo v genu *TAS2R38* pozorováno deset polymorfních míst, které podmiňují 16 haplotypů. U všech tří populací se vyskytovaly mutace na aminokyselinových pozicích 49, 262 a 296, v rámci kterých bylo pozorováno všech osm možných haplotypů. Z těchto haplotypů tvoří 94 % majoritní haplotypy PAV a AVI a haplotyp AAI, které byly jako jediné pozorovány u všech tří populací. Současně bylo ve zkoumaném souboru pozorováno celkem 14 genotypů, z nichž nejčastěji zastoupené byly právě ty vzniklé kombinací těchto tří haplotypů. Výsledky Kruskal-Wallisova testu rovněž ukazují, že genotypy genu *TAS2R38* jsou u zkoumaných afrických populací silným prediktorem chutnačství PTC. Haplotyp PAV je spojen s chutnačstvím a AVI naopak s nechutnačstvím PTC. Zároveň bylo potvrzeno, že PAV je ancestrálním haplotypem, který je evolučně nejbližší k šimpanzimu genu *TAS2R38*, a s největší pravděpodobností přinášel v minulosti nějakou výhodu. Rovněž bylo ukázáno, že různé druhy subsistenčních strategií nemají vliv na rozložení variant genu *TAS2R38* mezi populacemi. Žádný z pěti testů selekční neutrality neukázal statisticky signifikantní hodnoty, které by podporovaly model balancující selekce. Tento model tedy nelze přijmout ani vyloučit, ale je pravděpodobné, že v současné době už na gen *TAS2R38* v Africe selekce nepůsobí, či dochází k její relaxaci.

**Klíčová slova:** *TAS2R38*, haplotyp, hořká chuť, PTC, chutnačství, nechutnačství, subsistence, selekce, západní Afrika

## Abstract

The aim of this thesis is to determine whether the *TAS2R38* gene is under selection pressure in West Africa and if its diversity varies within populations practicing different modes of subsistence. It further focuses on polymorphisms occurring in the gene and their association with sensitivity to the bitter tasting compound PTC. The thesis analyses 147 samples of saliva from three Mauritanian populations in order to sequence the DNA of the *TAS2R38* gene exon. Ten polymorphic sites conditioning 16 haplotypes were observed in *TAS2R38* gene. Mutations in amino acid positions 49, 262 and 296 occurred in all three populations; all eight possible haplotypes were observed. 94 % of them constitutes major PAV and AVI haplotypes and AAI haplotype, all of which were detected in each of the three populations. Additionally, 14 genotypes were identified in our sample; the most common being those created by a combination of the three haplotypes. Kruskal-Wallis test showed that *TAS2R38* genotypes are strong predictors of PTC response in the examined African populations. PAV haplotype is associated with sensitivity to PTC (taster haplotype); conversely, AVI is a nontaster haplotype. At the same time, it was confirmed that PAV is an ancestral haplotype evolutionary closest to the chimpanzee *TAS2R38* gene and it probably carried some advantage in the past. It was also shown that different subsistence patterns do not affect the distribution of *TAS2R38* variants among populations. None of the five neutrality tests showed statistically significant results that would support the model of balancing selection. Therefore, this model can be neither accepted nor rejected, but it is likely that selection goes through relaxation or does no longer affect *TAS2R38* gene in Africa.

**Key words:** *TAS2R38*, haplotype, bitter taste, PTC, taster, nontaster, subsistence, selection, West Africa

# Obsah

1	Úvod .....	8
2	Cíle práce.....	10
3	Afrika.....	11
3.1	Geografické vyčlenění .....	11
3.2	Podnebí a biomy.....	11
3.3	Západní Afrika .....	12
3.3.1	Sahara .....	13
3.3.2	Sahel .....	14
4	Populace západní Afriky .....	15
4.1	Maurové .....	15
4.2	Soninkové.....	16
4.3	Fulbové.....	17
5	Subsistenční vývoj západní Afriky.....	19
6	Receptory hořké chuti.....	21
6.1	Citlivost receptorů k hořkým sloučeninám .....	23
7	<i>TAS2R38</i> .....	26
7.1	Varianty a haplotypy genu <i>TAS2R38</i> .....	29
7.1.1	Fenotypové projevy haplotypů a jejich rozložení ve světě.....	29
7.1.2	Souvislost se stravou.....	31
7.1.3	Působení přírodního výběru.....	32
7.1.4	Evoluce haplotypů .....	36
8	Materiál.....	37
9	Metody.....	38
9.1	Izolace DNA.....	38
9.2	Amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězové reakce .....	38
9.3	Gelová elektroforéza .....	39
9.4	Sekvenace DNA .....	40
9.5	Zpracování dat.....	41
9.5.1	Složení a zarovnání sekvencí DNA .....	41

9.5.2	Fázování.....	41
9.5.3	Vztahy mezi haplotypy .....	42
9.5.4	Korelace genotyp/fenotyp.....	43
9.5.5	Intrapopulační a interpopulační analýzy.....	43
9.5.6	Testy selekční neutrality .....	44
9.5.7	Definice ancestrálních a odvozených alel.....	46
10	Výsledky.....	47
10.1	Varianty a haplotypy genu <i>TAS2R38</i> .....	47
10.2	Korelace genotyp/fenotyp .....	51
10.3	Intrapopulační a interpopulační analýzy .....	53
10.4	Testy selekční neutrality .....	54
10.5	Definice ancestrálních a odvozených alel .....	55
11	Diskuze .....	57
11.1	Varianty a haplotypy genu <i>TAS2R38</i> .....	57
11.2	Fenotypové projevy genotypů a haplotypů .....	60
11.3	Vliv typu subsistence na varianty genu <i>TAS2R38</i> .....	63
11.4	Působení přírodního výběru .....	64
12	Závěr.....	67
13	Seznam zkratk.....	69
14	Seznam použité literatury .....	71
15	Přílohy .....	80

# 1 Úvod

Lidé jsou schopni rozlišit mezi pěti základními typy chutí, které jsou podmíněné velkým množstvím genů. Za percepci hořké chuti je zodpovědná genová rodina chuťových receptorů typu 2 (*TAS2R*), která čítá celkem 25 genů (Shi & Zhang, 2006) a ještě větší množství receptorů, které jsou jimi kódovány (Wooding et al., 2004). Jedněmi z nejvíce studovaných genů jsou *TAS2R16*, který je citlivý na  $\beta$ -glukopyranosidy (Bufe et al., 2002) a *TAS2R38*, jehož receptory zprostředkovávají reakce na látky obsahující thiokyanátovou skupinu (Bufe et al., 2005), konkrétně například na fenylothiokarbamid (PTC).

Schopnost cítit PTC substanci jako hořkou je v rámci lidské populace velice variabilní a je způsobena polymorfismy vyskytujícími se v tomto genu. Nejvíce známými a studovanými jsou mutace na nukleotidových pozicích 145, 785 a 886, respektive aminokyselinových pozicích 49, 262 a 296 (Kim et al., 2003), které podmiňují celkem osm haplotypů. Za majoritní haplotyp chutnačství PTC je považován PAV (prolin, alanin, valin), zatímco AVI (alanin, valin, izoleucin) je naopak majoritním haplotypem nechutnačství (Kim et al., 2003). Současně se v genu *TAS2R38* můžeme setkat také s mnoha dalšími haplotypy, které jsou podmíněné mutacemi typu jednonukleotidových polymorfismů (SNPs) na některé z dalších polymorfních pozic (Campbell et al., 2012). Haplotypy PAV a AVI tvoří s jejich frekvencí výskytu cca 50,8 % a 42,7 % převážnou většinu haplotypů genu *TAS2R38* u všech světových populací (Risso et al., 2016). V Africe se k tomu můžeme ve vyšších frekvencích setkat také s haplotypy AAI (alanin, alanin, izoleucin), či AAV (alanin, alanin, valin), které jsou zodpovědné za střední citlivost k PTC (Campbell et al., 2012; Risso et al., 2016).

Varianty genu *TAS2R38* jsou rovněž často spojovány se stravou. Tato souvislost vedla spolu s výskytem různých lokálních adaptací v reakci na typ stravy v Africe (Tishkoff et al., 2007) k myšlence, že by africké populace upřednostňující rozdílné druhy subsistence mohly mít v genomu zastoupeny varianty genu *TAS2R38* o různých frekvencích (Campbell et al., 2012). Zároveň se má za to, že schopnost hořké chuti se pravděpodobně vyvinula jako mechanismus vyhýbání se hořce chutnajícími toxickými látkami obsaženými v některých rostlinách (Wooding et al., 2004), na základě čehož by se dal předpokládat přirozený výběr (zvýšená reprodukční zdatnost) jedinců s PAV haplotypem.



Zachování variant genu *TAS2R38* je připisováno balancující selekci a také mladší rozrůžňující selekci (Campbell et al., 2012). Současně se udržení vysokých frekvencí haplotypu AVI připisuje tomu, že by tento haplotyp mohl kódovat funkční receptor pro zatím neidentifikovanou toxickou hořkou substanci (Wooding et al., 2004).

Tato práce navazuje na výzkum Campbella et al. (2012), kteří zkoumali evoluci genu *TAS2R38* u 611 jedinců z východní (Keňa a Tanzánie) a střední (Kamerun) Afriky a u 132 jedinců žijících mimo Afriku. Má práce je zaměřena na populace zemědělců (Soninků) a pastevců (Maurů a Fulbů) žijících v Mauritanii, kterými se výše uvedený výzkum z roku 2012 nezabývá. Zároveň tato diplomová práce čerpá z výzkumu Kulichové et al. (2022), jejichž výsledky studia evolučně příbuzného genu *TAS2R16* ukazují, že tento gen nebyl v sahelo-súdánském pásmu pod vlivem selekce, ačkoli předchozí výsledky takovou možnost naznačovaly (Campbell et al., 2014; Soranzo et al., 2005).

Diplomová práce je rozdělena do několika kapitol. Jako první uvádím literární přehled, ve kterém se věnuji jak oblasti výzkumu a populacím, ze kterých pocházejí vzorky zpracovávané v této práci, tak i samotnému genu *TAS2R38*. Rozpracována je jak geografie, tak i přírodní podmínky v Africe, především v té západní, zejména Mauritanii. Na část věnující se jednotlivým populacím, které tuto oblast obývají, navazuje kapitola o subsistenčním vývoji západní Afriky. Zbývající část literárního přehledu je zaměřena na receptory hořké chuti a konkrétně na gen *TAS2R38*, u kterého se podrobněji zabývám haplotypy, které se v tomto genu vyskytují, jejich evolucí, fenotypovými projevy a rozložením ve světě a v neposlední řadě také souvislostí se stravou a přírodním výběrem.

Další část práce je zaměřena na laboratorní postupy, vlastní analýzu a zpracování dat. Rozdělena je na kapitolu Materiál a poněkud obsáhlejší kapitolu Metody, v níž je velká část věnována interpretaci testů selekční neutrality. Následuje kapitola věnovaná výsledkům, které jsou dále interpretovány v oddílu Diskuze.

## 2 Cíle práce

Cílem této práce bylo zjistit, jaké alely genu *TAS2R38* jsou asociovány s vnímáním hořké chuti PTC v západní Africe, zda se vyskytují častěji u pasteveckých či zemědělských populací, a zda jsou některé z haplotypů pod vlivem selekce.

K dosažení tohoto cíle jsem zvolila následující kroky:

1. nasekvenovat 147 vzorků DNA pro exon genu *TAS2R38* od tří etnicky a subsistenčně odlišitelných populací Mauritánie (Fulbů, Maurů a Soninků),
2. zjistit veškeré varianty (genotypy) včetně těch, které způsobují záměny aminokyselin na pozicích 49, 262 a 296,
3. rekonstruovat haplotypy,
4. porovnat asociaci haplotypů se senzitivitou k hořké sloučenině PTC v souboru mauritánských populací,
5. zhodnotit genetické vzdálenosti mezi populacemi,
6. aplikovat základní testy selekční neutrality a zjistit, zda působila selekce a pokud ano, tak jakého typu.

## **3 Afrika**

### **3.1 Geografické vyčlenění**

Afrika je po Asii největším kontinentem naší planety. Tvoří ji celkem 54 zemí, které zabírají plochu přes 30 miliónů km<sup>2</sup> (Grosz-Ngaté et al., 2014). Na severu je Afrika oddělena od Evropy a Asie Středozemním mořem, které na severozápadě pokračuje přes Gibraltarský průliv do Atlantského oceánu. Ten omývá celou západní stranu afrického kontinentu, kdežto východní část Afriky je obklopena Indickým oceánem, který směrem na sever přechází v Rudé moře, na severu ohraničené Suezskou šíjí, kde dochází ke spojení Afriky s Asií. K Africe patří i mnoho ostrovů, z nichž největší je Madagaskar, který se rozkládá na jihovýchodě v Indickém oceánu.

### **3.2 Podnebí a biomy**

Afrika je jediný kontinent, který je rovníkem rozdělen téměř na shodné poloviny (UNEP, 2012). Převážná většina plochy Afriky se rozkládá mezi obratníky Raka a Kozorooha (UNEP, 2008), které vymezují tropický podnebný pás. Právě proto jsou na většině kontinentu po celý rok vysoké teploty. Zejména v oblasti pouští se setkáváme s velmi vysokými teplotami, které ale ve vyšších polohách v noci padají až k bodu mrazu. Severní pruh Afriky rozkládající se mezi Saharou a Středozemním mořem se klimatem podobá jižní Evropě. Většinu roku jsou zde vysoké teploty, které ale v zimě klesají. Obdobně je tomu i na jihu Afriky, kde se rovněž vyskytují chladná období, zde ale od června do září. V těchto okrajových oblastech může napadnout sníh, ale pouze ve vyšších nadmořských výškách. S nižšími teplotami se obecně můžeme setkat ve všech pohořích Afriky (i v těch tropických), typickým příkladem je Kilimandžáro (Grosz-Ngaté et al., 2014).

S teplotami souvisejí také srážky, jejichž množství je v Africe velice variabilní. Na tvorbu srážek má vliv především nízký tlak v okolí rovníku, vysoký tlak v subtropickém pásu a sezónnost. V tropické části Afriky můžeme na základě srážek a teplot vyčlenit čtyři hlavní klimatické zóny. První z nich je vlhké tropické podnebí, které odpovídá oblasti

tropických pralesů, kde se déšť objevuje po celý rok. Dalšími jsou střídavě vlhké tropické podnebí v oblasti savan s obdobím dešťů trvajícím kolem šesti až deseti měsíců a semiaridní tropické podnebí, které se vyskytuje v oblasti sahelu, etiopské náhorní plošiny a jižní části Afriky, kde období dešťů trvá méně než půl roku. Poslední klimatickou zónou je aridní (suché) tropické podnebí pouště Sahara, které odpovídá nejsušším částem Afriky s minimem srážek (Grosz-Ngaté et al., 2014). V některých zdrojích se můžeme setkat i s pátou klimatickou zónou nazývanou středomořské podnebí, která se vyskytuje pouze v severních a jižních okrajových částech Afriky (UNEP, 2008).

Současně je také celý africký kontinent dělen do biogeografických pásem, tzv. biomů. Biomem rozumíme oblast s výskytem ekologicky podobných společenství rostlin a živočichů. Biomy jsou definovány teplotami, srážkami a klimatem, a právě proto jejich výskyt koresponduje s výše zmíněnými klimatickými zónami. V oblastech středomořského podnebí můžeme najít středomořský biom. Izolovaně se v Africe vyskytuje také horský biom, a to převážně ve vysokých nadmořských výškách (UNEP, 2008). Biom deštných pralesů se vyskytuje v oblastech s vlhkým tropickým podnebím, pouště naopak v místech s aridním tropickým podnebím. Mezi těmito dvěma extrémy najdeme patrně nejcharakterističtější biom Afriky, a sice tropické savany pokrývající převážnou většinu zemědělsky využívané plochy kontinentu. Savany se vyznačují výskytem pastvin posetých trávou, keři a místy i stromy. Někdy rozeznáváme lesní savany vyskytující se ve střídavě vlhkých tropických oblastech a keřové savany charakteristické pro místa se semiaridním tropickým podnebím. Nejznámější keřovou savanou je sahel, krajinný typ rozkládající se v horizontálně se táhnoucím pásu jižně od Sahary (Grosz-Ngaté et al., 2014).

### **3.3 Západní Afrika**

Západní Afrika je oblast sestávající se z 15 států. Konkrétně to jsou Mauritánie, Mali, Niger, Senegal, Gambie, Guinea Bissau, Guinea, Sierra Leone, Libérie, Pobřeží slonoviny, Burkina Faso, Ghana, Togo, Benin a Nigérie. Západ a jih regionu je ohraničen Atlantským oceánem, na severu se rozkládá poušť Sahara. Východní hranice regionu naopak není tak jasně

vyznačena. Táhne se od Guinejského zálivu po hranici mezi Kamerunem a Nigérií k Čadskému jezeru a dále pokračuje po hranici států Niger a Čad.

Západní Afrika je převážně rovinatá (UNEP, 2012) a skládá se z několika typů biomů. Na severu je Sahara, na kterou postupně navazuje pásmo sahelu, a jižněji i lesní savany. Úplný jih regionu je pokryt deštnými lesy. Stejný přechod můžeme vidět u klimatických zón, které směrem ze severu na jih přecházejí od aridního tropického podnebí pouště a semiaridního tropického podnebí sahelu přes střídavě vlhké tropické oblasti až po vlhké tropické podnebí deštných lesů (Grosz-Ngaté et al., 2014). Ve své práci se zaměřuji zejména na Saharu a sahel, jelikož právě ty tvoří největší část Mauritanie, z níž pocházejí vzorky zpracovávané v této práci.

### 3.3.1 Sahara

Sahara je největší poušť světa sahající od Atlantského oceánu až k Rudému moři. Rozkládá se na ploše více než 7 miliónů km<sup>2</sup> a odděluje severní Afriku od tropické. Většina Sahary je řazena do kategorie hyperaridních pouští (Mares, 2017), obecně ale spadá do aridního tropického podnebí (Grosz-Ngaté et al., 2014). To je charakterizováno větrným počasím, suchým vzduchem a vysokými teplotami, které jsou v průběhu dne velice proměnlivé. V červenci se nejčastěji setkáme s teplotami nad 37 °C, výjimkou nejsou ani teploty nad 43 °C. Noci jsou naopak spíše chladné, v zimním období může dokonce ve vyšších polohách mrznout. Srážky se v poušti vyskytují s ohledem na distribuci i množství velice nepravidelně, nejčastěji v podobě náhlých krátkých bouřek (Mares, 2017).

Více než jedna třetina západní Sahary je pokryta pískem. Na polovině tohoto území není téměř žádná trvalá vegetace, i když některé duny mohou být zpěvněny několika druhy jednoletých rostlin. Na určitých místech můžeme pozorovat také výskyt oáz a vádí, kde se pěstuje datlovník pravý *Phoenix dactylifera*. Rostou zde i stromy a velké keře rodu *Tamarix*, palmy rodu *Hyphaene* a různé druhy akácií *Acacia* (Mares, 2017).

### 3.3.2 Sahel

Sahel není přesně definovaný geografický region. Jedná se spíše o přibližně 400 km široký přechodový pás mezi Saharou na severu a savanami na jihu, který se, stejně jako Sahara rozkládá na území od Atlantského oceánu až k Rudému moři (Mares, 2017; UNEP, 2012). V západní Africe zahrnuje státy Mauritánie, Senegal, Mali, Niger, Burkina Faso a Nigérie. Pásmo sahelu je zde tvořeno zejména plochou krajinou porostlou travinovou vegetací, jen občas se zde objeví nevysoké skalní útvary typu eskarpmentu (UNEP, 2012).

Jak už bylo zmíněno výše, sahel spadá do semiaridního tropického podnebí vyznačujícího se střídáním období sucha a období dešťů (Grosz-Ngaté et al., 2014). Období dešťů trvá obvykle dva až čtyři měsíce a přichází na konci června. Srážky jsou dány monzunem přicházejícím ze západu a jihu od Atlantského oceánu. Jejich množství se pohybuje od 100 mm na severu až k 1000 mm na jihu a vytváří tak pro sahel typický gradient ročního úhrnu srážek (tzv. izohyety). V období sucha (únor, březen) se naopak objevuje suchý vítr harmatan, který přichází ze Sahary (UNEP, 2012).

Klíma, a zejména srážkový gradient, v této oblasti výrazně ovlivňují vegetaci. Po celém sahelu se vyskytují traviny a dřeviny, jejichž hustota roste směrem na jih, kde jsou srážky častější a také vydatnější. Ze zástupců rostlin, můžeme vyšší diverzitu pozorovat opět na vlhčím jihu, zatímco na severu se dominantními druhy stali zástupci rodu *Acacia*. Zatímco severní část sahelu je využívána zejména pastevci, jižní část je osídlena spíše zemědělci (UNEP, 2012).

## 4 Populace západní Afriky

Jak už bylo uvedeno výše, západní Afrika je rozlehlá oblast skládající se z 15 států, které obývá mnoho různých populací. Ve své práci se zaměřím pouze na tři populace Mauritánie, od kterých pocházejí vzorky analyzované v této práci. Konkrétně to jsou kočovní pastevci (Maurové a Fulbové) a usedlí zemědělci (Soninkové).

### 4.1 Maurové

Termín Maurové je v dnešní době používán primárně pro označení 70 % obyvatel Mauritánie. Současně se jím označují i někteří obyvatelé Západní Sahary, jelikož byla od roku 1975 okupována Marokem a krátce i Mauritánií. V rámci Maurů můžeme rozlišit dvě hlavní skupiny – *bidanis* a *sudanis*. *Sudanis* je termín používaný pro Maury afrického původu. Tato skupina je příbuzná s jinými etniky, jako jsou například Soninkové a Fulbové. *Bidanis* jsou naopak Maurové berbersko-arabského původu. Většina Maurů používá jako svůj hlavní jazyk arabštinu, běžná je ale také francouzština, jakožto pozůstatek kolonialismu, nebo různé berberské jazyky (Stokes, 2009).

Maurové představují kočovnou populaci pastevců, kteří v průběhu roku cestují se svými zvířaty za zdroji vody a pastvou. Tento způsob života zvolili zejména z důvodu výskytu rozsáhlých pouští na většině plochy Mauritánie, které jsou nevhodné pro zemědělství. Mauři chovají převážně dobytek, někdy také ovce, kozy, osly, velbloudy a koně. Dobytek se nejvíce vyskytuje v jižnějších částech Mauritánie, v pásu sahelu, a to zejména v období dešťů. V období sucha se stáda přesouvají k pastvinám podél břehu řeky Senegal. Usedlí Maurové se věnují farmaření v jižních oblastech Mauritánie, zejména pěstování kukuřice, melounů, datlí, rýže, luštěnin či čiroku a chovu drůbeže. Mnoho z nich žije také v pouštích v oblastech oáz, kde se mohou věnovat zemědělství. Těžkou zemědělskou práci obstarávají muži, zatímco ženy vyrábějí zboží z kůže a tkanin a starají se o stavbu stanů (Stokes, 2009).

Je třeba poznamenat, že tradiční život Maurů je ohrožen procesem desertifikace. Rozšiřování pouští omezuje jak pastevectví kočovných Maurů, tak i zemědělství zhruba 60 % Maurů, kteří dnes žijí ve vesnicích, jelikož jim znemožňuje spoléhat se na úrodnou zem jako na zdroj obživy. Právě z těchto důvodů je mnoho Maurů nuceno pozměnit svůj životní

styl, či se ho úplně vzdát. Kočovného způsobu života se Mauri vzdávají i vlivem urbanizace a industrializace a dávají přednost například práci v železných dolech na severozápadě země či, v případě mladých Maurů, studiu na univerzitách (Stokes, 2009).

## 4.2 Soninkové

Soninkové, známí také pod jmény Serakole, Sarakole nebo Serahule (Nwanunobi, 1996), jsou etnická skupina rozšířená v mnoha státech Afriky. Jejich populace čítá kolem dvou miliónů jedinců. Největší skupiny můžeme nalézt v Mali, Burkině Faso a Pobřeží slonoviny. Menší komunity se vyskytují například v Mauritánii, Senegal, Gambii, Guineji Bissau a Guineji (Stokes, 2009), další jsou pak i v Ghaně, Nigérii, Kamerunu, Gabonu, Kongu, Středoafričské republice a Demokratické republice Kongo (Nwanunobi, 1996).

Co se týče jazyka Soninků, ten spadá do skupiny mandé náležící do rodiny nigero-konžské. Soninkové ale většinou mluví jazykem země, ve které žijí, a proto není jejich jazyk moc používán (Stokes, 2009). Jazyková skupina mandé se vyznačuje tonálními jazyky. Slovo z jazyka Soninků tedy může mít různé významy podle toho, zda se vysloví vysokým, středním nebo nízkým tónem (Nwanunobi, 1996).

Historicky jsou Soninkové známí tím, že založili jednu z největších afrických říší – říši Ghana, která byla prvním velkým státním celkem ve středověké západní Africe. Tato říše byla lokalizována na jižním okraji pouště Sahara. Soninkové zde zastávali vysoce postavené pozice v politice, ekonomice a dalších oblastech, v současnosti jsou to zejména obchodníci. V Ghaně, Burkině Faso a Pobřeží slonoviny se věnují obchodu s různým zbožím od zlata po kolové ořechy. V Senegal pěstují a prodávají arašidy a obchodují s rýží. V Mauritánii se věnují farmaření a obchodu s arabskou gumou. Naopak v Nigérii pracují zejména v dolech (Nwanunobi, 1996).

Schopnost Soninků podnikat a obchodovat můžeme dokumentovat i tím, že do konce 19. století jich mnoho z nich vlastnilo otroky, i když někteří z nich byli sami otroky. Na jejich farmách tedy pracovali otroci a vysoce postavení Soninkové vlastnili většinu zboží, které otroci produkovali. Mladí Soninkové měli zároveň dostatek času na to, aby mohli usilovat o různé obchodní příležitosti. Poté, co bylo otroctví zrušeno, museli pozměnit svůj způsob



obchodování. Soninští migranti začali kupovat dobytek, zatímco někteří mladí lidé začali pracovat v Evropě, což ve značné míře přetrvává až dodnes. Soninkové stále migrují a mnoho z nich pracuje v zahraničí, zejména ve Francii. I přes to si ale většina Soninků udržuje pevné vazby s rodinou a jejich komunitami, ke kterým se po čase vrací, a díky vydělaným penězům si užívají života na vyšší úrovni (Nwanunobi, 1996).

### 4.3 Fulbové

Fulbové, jinak známí také jako Foulah, Peulh, Peul, Fulfulde nebo Fulbe, jsou jedna z největších a kulturně nejvýznamnějších etnických skupin západní Afriky (Černý et al., 2006; Stokes, 2009). Žijí v prostoru sub-saharské Afriky rozprostírajícího se od Sahary až po tropické deštné lesy a od Atlantiku až po oblast Modrého Nilu v Súdánu. Jejich populace čítá téměř 30 miliónů jedinců, kteří obývají celkem 17 států (Černý et al., 2006). Velké skupiny se vyskytují například v Mali, Nigeru, Čadu, Senegal, Gambii, Guinei, Burkině Faso, Nigérii a Kamerunu, menší můžeme nalézt ve zbytku západoafrických států (Stokes, 2009). Z populačně genetického hlediska jsou ze všech tří skupin v rámci sahelu nejsledovanější (Černý et al., 2011; Nováčková et al., 2020; Priehodová et al., 2020; Vicente et al., 2019).

Jazykem Fulbů je fulbština (*fulfulde*), která je řazena do západoatlantské skupiny nigero-konžské jazykové rodiny. Kvůli širokému geografickému rozšíření Fulbů je tento jazyk značně rozrůzněný; existuje několik dialektů. Většina Fulbů zároveň považuje za nezbytné mluvit také jazykem země, ve které žijí. Někteří se dokonce učí i některý z minoritních jazyků dané oblasti a běžná je také znalost angličtiny či francouzštiny, zejména kvůli tlaku západního školství (Ndukwe, 1995).

Fulbové jsou původně pastevecká kočovná populace, ale postupem času začali přecházet i k usedlému způsobu života, který v dnešní době preferuje většina z nich. Obě skupiny spolupracují, i když žijí odděleně. Kočovní Fulbové osidlují zejména střední pásmo savan, kde jsou zároveň i nejpočetnější pasteveckou skupinou. Většinu svého času tráví zejména chovem zvířat, který představuje centrální aspekt jejich kulturní identity. Muži se věnují pastvě, zatímco ženy prodávají mléko a mléčné výrobky na trzích (Černý et al.,

2006). V průběhu roku rovněž praktikují transhumace, což jsou sezónní migrace za pastvinami a zdroji vody (Černý, 2006). V obdobích sucha můžeme pozorovat jejich přesun na jih, v obdobích dešťů se naopak se svými stády vrací na sever (Černý et al., 2006). Mimo to vedou celkem jednoduchý život, staví si dočasné přístřešky či s sebou nosí přenosné chatky (Stokes, 2009). Usedlí Fulbové se naopak věnují zemědělství, zejména pěstování čiroku, ale řada z nich žije i ve městech, kde působí jako učitelé, státní úředníci nebo vykonávají různé náboženské funkce (Černý et al., 2006; Stokes, 2009).

## 5 Subsistenční vývoj západní Afriky

V Africe došlo přibližně před 9 tisíci lety k zásadní změně v ekologii člověka a konzumaci potravin (Phelps et al., 2020). Zatímco v období paleolitu se všichni lidé živilí lovem divokých zvířat a sběrem volně rostoucích rostlin (Konner & Eaton, 2010), během neolitu došlo na jedné straně k vývoji zemědělské a na straně druhé pastevecké subsistence (Phelps et al., 2020). Tato dichotomie je patrná v obživě současných tradičních populací Mauritánie, jak bylo uvedeno v předchozí kapitole, de facto dodnes.

Pro pochopení pravěké subsistenční diferenciace populací, které v této práci hodnotím, je důležitá zejména lokalita Dhar Tišit.

Celá okolní oblast je tvořena sérií pískovcových útesů, tzv. eskarpmentů, lokalizovaných v jižní až střední Mauritánii v oblasti jihozápadní Sahary. Archeologická naleziště se nacházejí na více než 650 km<sup>2</sup> v oblasti, která se vyznačuje několika důležitými topografickými rysy. Najdeme zde jak útesy tyčící se v průměru 60 m nad písčítými plochami, tak i mělké pánve, které byly dříve zaplněny sladkovodními jezery. V celé oblasti se sezónně vyskytuje také několik malých řek vytvářejících zde tzv. vádí (Holl, 1985a, 1985b).

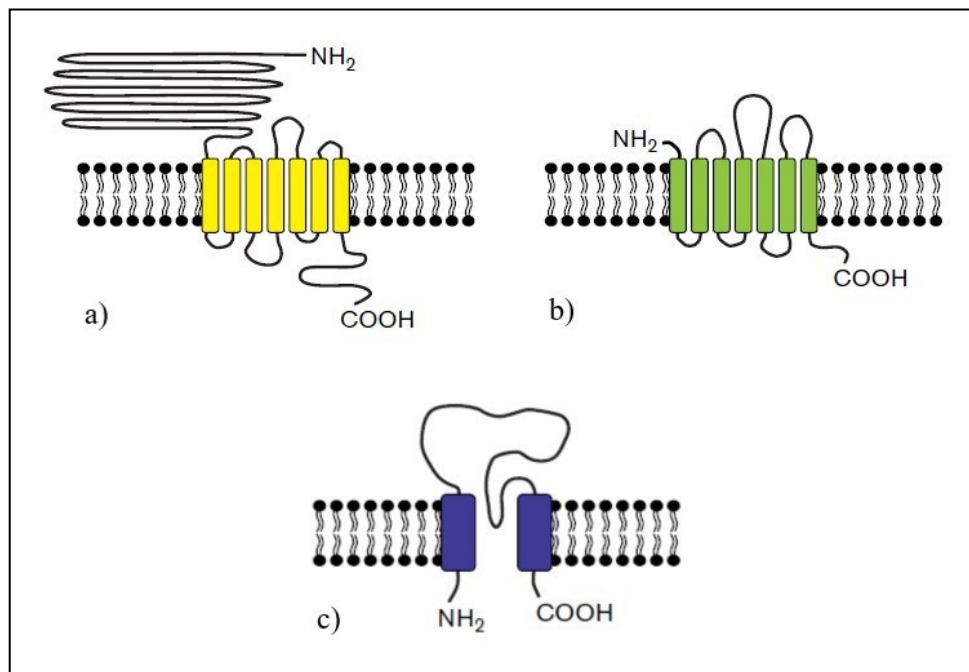
Klima bylo v celé severní Africe v časném holocénu (před cca 10 až 7,5 tisíci lety) vlhčí (Vernet, 2002), takže se v Dhar Tišit díky uvedené topografii utvořila velká jezera (Holl, 2009). V následujícím období středního holocénu (před 7,5 až 4,2 tisíci lety) převažovalo několik století suché klima, ve kterém většina jezer vyschla, a následně klima teplé, při kterém se střídala vlhčí období (s vrcholy před cca 6,7 a 4,5 tisíci lety) s obdobími sucha (s vrcholy před cca 6,4, 5,5 a 4,8 tisíci lety) (Vernet, 2002). Tyto klimatické oscilace jsou patrné i v následujících letech, kdy bylo období sucha opět vystřídáno vlhčím obdobím převažujícím před 3,9 až 3,3 tisíci lety (Maley & Vernet, 2015). V této době se zde pravděpodobně ustálilo působení letního monzunu, tedy klimatický vzor dvou kontrastních období typický pro tuto oblast – delší období sucha trvající kolem 7 až 9 měsíců a kratší období dešťů (Holl, 2009; Maley & Vernet, 2015). Před 3 až 2,7 tisíci lety došlo v tomto vzoru ke změně, jelikož se období dešťů začalo prodlužovat. Pozdní holocén (před cca 2,7 až 2,5 tisíci lety) byl následně charakterizován posunem směrem ke zvýšené ariditě s delšími „epizodami“ sucha (Maley & Vernet, 2015).

Před zhruba 4000 lety byla oblast Dhar Tišit obsazena agropastevci, kteří do této oblasti přišli z vysychající Sahary (Holl, 1985a, 1985b; Vernet, 2002). Tyto skupiny lze charakterizovat poměrně širokým spektrem subsistenčních strategií, které zahrnovaly kromě pěstování dochanu klasnatého *Pennisetum glaucum* a chovu hovězího dobytka, ovcí a koz, také lov divoké zvěře, sběr zrn volně rostoucích trav či nejrůznějších plodů a rybaření (Holl, 1985a). Osídlení oblasti bylo možné zejména díky dostatečným zdrojům vody (jezera, řeky, potoky, prameny) a dešťům, jejichž rozložení, intenzita a načasování byly ovšem každý rok dosti nepředvídatelné. To neumožnilo tamním populacím zaměřit se na jeden z výše uvedených způsobů obživy a namísto toho byly nuceny udržovat spíše širší subsistenční portfolio (Holl, 2009). V pozdním holocénu začalo docházet ke zvýšené ariditě, a tak byli obyvatelé této oblasti přibližně kolem roku 300 až 200 př. n. l. nuceni k přesunu na jih a východ do oblastí s vyšším množstvím srážek či vodních zdrojů (Holl, 1985b; Holl, 2009).

Je zřejmé, že sezonalita a dostupnost vodních a potravních zdrojů měla na život agropastevců v této době značný vliv. Můžeme to potvrdit i nálezy z Dhar Tišit, které ukazují, že agropastevci obývali dva rozdílné typy míst a v každém období preferovali jiný způsob obživy. V období sucha obývali rozptýlené dočasné tábory v mělkých pánvích poblíž sladkovodních jezer a jiných zdrojů vody a věnovali se kromě chovu domácích zvířat i rybaření a sběru rostlin. V období dešťů se naopak uchýlovali do vesnic trvalejšího charakteru na plošinách pískovcových útesů, pěstovali dochan klasnatý a chovali dobytek. Lov divoké zvěře byl praktikován nejspíše celoročně (Holl, 1985b).

## 6 Receptory hořké chuti

Lidé jsou schopni rozlišit mezi pěti základními typy chutí – sladkou, slanou, kyselou, hořkou a umami, která je podmíněna citlivostí k aminokyselině (AK) glutamátu (Ikeda, 2002). Percepce slané a kyselé chuti je způsobena iontovými kanály, zatímco u sladké, hořké a umami se na senzitivitě podílejí receptory spřažené s G-proteiny (GPCRs) (Gilbertson et al., 2000; Smith & Margolskee, 2001). Membránové topologie těchto struktur můžeme vidět na obrázku č. 1. GPCRs jsou obsaženy v mikrokldcích chuťových buněk, což jsou modifikované epitelové buňky, které mají mnoho neurálních vlastností (např. schopnost depolarizace). Zároveň jsou elektricky vzrušivé a tvoří synapse s aferentními chuťovými nervovými vlákny. Padesát až sto chuťových buněk tvoří seskupení nazývaná chuťové pohárky, které jsou nejčastěji uloženy v tzv. papilách. Na jazyku se vyskytují např. papily hrozené, listovité a houbovitě (Gilbertson et al., 2000; Smith & Margolskee, 2001).



**Obr. 1.** Membránové topologie GPCRs a iontových kanálů vyskytujících se v chuťových buňkách: a) receptor rodiny *TAS1R* (sladká a umami chuť), b) receptor rodiny *TAS2R* (hořká chuť), c) iontový kanál (kyselá a slaná chuť) (převzato a upraveno podle Gilbertson et al., 2000).

Dvě hlavní třídy chuťových receptorů (TAS1R a TAS2R) jsou u savců kódovány genovými rodinami chuťových receptorů typu 1 a 2 (*TAS1R* a *TAS2R*), známými také pod zkratkami *T1R* a *T2R* (Adler et al., 2000; Hoon et al., 1999). Rodina *TAS1R* se sestává pouze ze tří genů – *TAS1R1*, *TAS1R2* a *TAS1R3* (Hoon et al., 1999; Nelson et al., 2001), uložených v klastru na chromozomu 1p36 (Liao & Schultz, 2003). Produkty těchto genů jsou tvořeny sedmi transmembránovými segmenty a vyznačují se dlouhou N-terminální doménou (Hoon et al., 1999). Zároveň tvoří heterodimery, které se sdružují v receptory sloužící k percepci sladké a umami chuti (Li et al., 2002). Sladkou chuť podmiňují heterodimery proteinů *TAS1R2* a *TAS1R3* (Nelson et al., 2001), chuť umami naopak zajišťují heterodimery *TAS1R1* a *TAS1R3* (Nelson et al., 2002).

Z druhé genové rodiny se u člověka vyskytuje 25 funkčních *TAS2R* genů (Shi & Zhang, 2006), jejichž produkty jsou zodpovědné za percepci hořké chuti (Chandrashekar et al., 2000). Tyto geny neobsahují introny a jsou exprimovány v některých chuťových buňkách jazyka a měkkého patra. Kódují receptory se sedmi transmembránovými segmenty a krátkou extracelulární N-terminální doménou, které vykazují 30 až 70 % shodu aminokyselinové sekvence. Konzervativní motivy se vyskytují v prvních třech a v posledním transmembránovém segmentu, stejně tak jako ve druhé cytoplazmatické smyčce. Nejvíce se mezi sebou liší extracelulární segmenty (Adler et al., 2000).

**Tabulka 1.** Lokalizace genů *TAS2R*

Oblast	Gen		
5p	<i>TAS2R1</i>		
7q	<i>TAS2R3</i>	<i>TAS2R16</i>	<i>TAS2R40</i>
	<i>TAS2R4</i>	<i>TAS2R38</i>	<i>TAS2R41</i>
	<i>TAS2R5</i>	<i>TAS2R39</i>	<i>TAS2R60</i>
12p	<i>TAS2R7</i>	<i>TAS2R14</i>	<i>TAS2R42</i>
	<i>TAS2R8</i>	<i>TAS2R19 (48)</i>	<i>TAS2R43</i>
	<i>TAS2R9</i>	<i>TAS2R20 (49)</i>	<i>TAS2R45</i>
	<i>TAS2R10</i>	<i>TAS2R30 (47)</i>	<i>TAS2R46</i>
	<i>TAS2R13</i>	<i>TAS2R31 (44)</i>	<i>TAS2R50</i>

(podle Adler et al., 2000; Conte et al., 2002; Fischer et al., 2005)

Identifikované *TAS2R* geny jsou lokalizovány v klastrech na třech chromozomech v oblastech 5p, 7q a 12p. Na chromozomu 5 je lokalizován pouze gen *TAS2R1*, a to v oblasti 5p15.2 (Adler et al., 2000). Zbylé geny, jejichž konkrétní názvy uvádí tabulka č. 1, se vyskytují v klastru (cca 3 Mb) na chromozomu 7 a na chromozomu 12 v klastru dlouhém 1,2 Mb (Conte et al., 2002). Mimo to se v lidském genomu vyskytuje také 11 pseudogenů (Shi & Zhang, 2006).

Pseudogen je sekvence charakterizovaná ztrátou funkce, která je přítomná v genomu dané populace a vykazuje určité podobnosti s jedním či více paralogními geny s normální funkcí. Za jeho vznik je nejčastěji odpovědná genomová duplikace, při které může některý z duplikovaných genů ztratit svou funkci, jelikož přinášela nějakou selekční nevýhodu, či neposkytovala z evolučního hlediska selekční výhodu, a stát se tak pseudogenem. Dalším mechanismem vzniku je například retrotranspozice, pomocí které vznikají retropseudogeny (Mighell et al., 2000).

I přes to, že bylo identifikováno 25 funkčních *TAS2R* genů (Shi & Zhang, 2006), je pravděpodobné, že lidé mají mnohem víc než jen 25 receptorů hořké chuti, jelikož každá jednotlivá alela *TAS2R* genu může kódovat jiný receptor. Mohly bychom mít tedy tolik receptorů, kolik máme celkem *TAS2R* alel (Wooding et al., 2004).

## 6.1 Citlivost receptorů k hořkým sloučeninám

*TAS2R* receptory jsou schopné detekovat různorodou škálu hořkých sloučenin, jak můžeme vidět v tabulce č. 2 (viz 7. kapitola) a v příloze č. 1. Jelikož je množství těchto sloučenin mnohem větší než množství receptorů, vyvstává otázka, jak je možné, že jsme schopni detekovat tak širokou škálu hořkých sloučenin s pouze 25 *TAS2R* geny.

Původní výzkumy totiž naznačovaly, že jednotlivé receptory jsou citlivé pouze k určitému malému množství hořkých sloučenin, jako je tomu například u receptoru *TAS2R4*, u kterého se předpokládalo, že odpovídá pouze na denatonium-benzoát a 6-n-propylthiouracil (Chandrashekar et al., 2000). Další výzkumy ale ukázaly, že receptory jsou schopné rozpoznávat širší spektrum hořkých sloučenin, jako například receptor *TAS2R16*, který je citlivý na  $\beta$ -glukopyranosidy (Bufe et al., 2002), nebo *TAS2R38* reagující na sloučeniny

s thiokyanátovou skupinou (Bufe et al., 2005). Později bylo navíc zjištěno, že tyto receptory neodpovídají pouze na chemicky podobné látky (Meyerhof et al., 2010), ale i na velmi různorodé široké spektrum sloučenin, které nesdílí žádnou společnou chemickou strukturu, stejně jako například receptory TAS2R14 a TAS2R46 (Behrens et al., 2004; Brockhoff et al., 2007).

Na základě toho Meyerhof et al. (2010) rozdělili všechny TAS2R receptory do čtyř skupin. Do první spadají receptory TAS2R16 a TAS2R38, které odpovídají na větší množství sloučenin, z nichž většina sdílí nějakou chemickou strukturu, i když se mohou vyskytnout i takové, které ji postrádají. V případě receptoru TAS2R16 jsou to například již zmíněné  $\beta$ -glukopyranosidy (např. amygdalin a salicin), u kterých je podstatná přítomnost hydrofobního zbytku spojeného s glukózou pomocí  $\beta$ -glykosidové vazby. Zásadní je jak  $\beta$ -konfigurace glykosidové vazby, tak i sterická pozice hydroxylové skupiny na C4 pyranózy (Bufe et al., 2002).

Druhá skupina dělení podle Meyerhofa et al. (2010) se skládá z receptorů TAS2R3, TAS2R5, TAS2R8, TAS2R13, TAS2R20 a TAS2R50, z nichž je každý aktivován několika málo ligandy, které mají společné některé chemické strukturní charakteristiky. Do této skupiny řadíme i receptory TAS2R9 a TAS2R41 zkoumané v rámci jiných výzkumných projektů (Dotson et al., 2008; Thalmann et al., 2013). Do třetí skupiny spadají receptory TAS2R1, TAS2R4, TAS2R7, TAS2R30, TAS2R31, TAS2R39, TAS2R40 a TAS2R43. Každý z těchto receptorů odpovídá na 10 až 25 sloučenin, které mezi sebou nesdílejí žádné chemické motivy (Meyerhof et al., 2010).

Poslední skupinu tvoří receptory TAS2R10, TAS2R14 a TAS2R46 citlivé jednotlivě na více než 40 hořkých sloučenin, které opět nemají společnou žádnou chemickou strukturu (Meyerhof et al., 2010). Do této skupiny můžeme v současné době řadit i receptor TAS2R39, dříve řazený do třetí skupiny, jelikož u něj bylo v posledních letech identifikováno mnoho nových ligandů (Lossow et al., 2016; Roland et al., 2013). Současně k tomuto dělení můžeme také stále nalézt některé TAS2R receptory, které zůstávají bez ligandu. Konkrétně to jsou TAS2R19, TAS2R42, TAS2R45 a TAS2R60 (Thalmann et al., 2013).

Zároveň si můžeme všimnout, že jeden určitý ligand neaktivuje pouze jeden receptor. Nejčastěji zastoupenými jsou například difenidol, který stimuluje celkem 15 receptorů, chinin



stimulující devět receptorů, chlorfenamin a denatonium-benzoát s osmi receptory a amarogentin se sedmi receptory. I přes to se ale převážná většina sloučenin váže pouze k jednomu či dvěma receptorům (Meyerhof et al., 2010).

## 7 *TAS2R38*

Jeden z nejvíce studovaných genů kódujících receptory hořké chuti je *TAS2R38*. Jak už bylo zmíněno výše, receptory kódované tímto genem zprostředkovávají reakce na látky obsahující thiokyanátovou skupinu N–C=S (Bufe et al., 2005). Všechny ligandy receptoru *TAS2R38* můžeme vidět v tabulce č. 2. Mezi nejznámější a ve výzkumech nejvíce používané patří sloučeniny 6-n-propylthiouracil (PROP) a fenylthiokarbamid (PTC), u kterých můžeme pozorovat bimodální distribuci fenotypů (Barnicot et al., 1951; Fox, 1932). Citlivost k těmto látkám je určována pomocí prahu citlivosti, který je definován jako nejnižší koncentrace, při které je možné danou látku detekovat z čisté vody. Lidé rozpoznávající tyto látky mají práh nízký, jelikož jsou vysoce senzitivní za nízkých koncentrací, zatímco lidé nerozpoznávající tyto látky mají práh vysoký, protože jsou za nízkých koncentrací naopak málo senzitivní (Tepper, 1998).

**Tabulka 2.** Hořké sloučeniny fungující jako ligandy genu *TAS2R38*

Gen	Ligandy	
<i>TAS2R38</i>	přírodní	allyl izothiokyanát, ethylpyrazin, fenylethyl izothiokyanát, johimbin, limonin, sinigrin
	syntetické	acetylthiourea, cyklamát sodný, dimethylthioformamid, difenidol, difenylthiourea, ethylthiourea, ethylenthiourea, fenylthiokarbamid, chlorfenamin, kaprolaktam, methimazol, 6-methyl-2-thiouracil, methylthiourea, 5-propyl-2-thiouracil, 6-n-propylthiouracil, thiokyanatan sodný

(podle Lossow et al., 2016; Meyerhof et al., 2010)

Optimálním stimulem pro *TAS2R38* receptor je pravděpodobně PTC, jelikož se k receptoru váže mnohem silněji než PROP. Lidé jsou zároveň schopni PTC detekovat při poměrně nízkých koncentracích a současně je jejich rozsah vnímání u PTC širší než u PROP.

To naznačuje, že by senzitivita k PROP mohla být z části ovlivňována i jinými genetickými či environmentálními faktory (Bufe et al., 2005).

Schopnost citlivosti k PTC je dědičným znakem, který do dnešní doby není úplně znám, i když se má za to, že má znaky jak Mendelovské, tak i komplexní dědičnosti (Drayna, 2005). Vznik převážné většiny fenotypových variant ve vnímání PTC je připisován lokusu na dlouhém raménku chromozomu 7 (Drayna et al., 2003), kde jsou uloženy varianty genu *TAS2R38* kódujícího receptory hořké chuti (Kim et al., 2003). Tyto varianty odpovídají za bimodalitu vnímání PTC v lidské populaci a zároveň také za 55 až 85 % (přibližně 75 %) fenotypových variant (Kim et al., 2003; Prodi et al., 2004). Zbylé jsou připisovány například lokusu 16p a mnoha dalším (Drayna et al., 2003).

Gen *TAS2R38* je tvořen pouze jedním exonem o délce 1002 bp, který kóduje 333 aminokyselin (AK) dlouhý receptor typu GPCRs tvořený sedmi transmembránovými doménami (Kim et al., 2003). V kódující oblasti tohoto genu bylo lokalizováno celkem 21 jednonukleotidových polymorfismů (SNPs), z nichž 19 způsobuje nesynonymní záměny AK. Převážná většina z nich byla pozorována ve velmi nízkých frekvencích pouze u afrických populací. Pouze tři z nich se vyskytují ve vysokých frekvencích po celém světě (Campbell et al., 2012) a můžeme je vidět v tabulce č. 3.

**Tabulka 3.** Hlavní SNPs v genu *TAS2R38*

Pozice nukleotidu	Alela	Pozice AK	Alela	Předpokládaná lokace
145	C	49	prolin	první intracelulární smyčka
	G		alanin	
785	C	262	alanin	šestá transmembránová doména
	T		valin	
886	G	296	valin	sedmá transmembránová doména
	A		izoleucin	

(převzato a upraveno podle Drayna, 2005)

Tři hlavní polymorfismy, známé také pod označeními rs713598, rs1726866 a rs10246939 (Campbell et al., 2012), způsobují záměny AK na pozicích 49, 262 a 296, které se vyskytují v první intracelulární smyčce a šesté a sedmé transmembránové doměně receptoru (Kim et al., 2003). Na pozici 49 je možný buď výskyt AK prolinu, nebo AK alaninu (P49A) způsobený záměnou nukleotidu C na G. Na pozici 262 se střídá výskyt AK alaninu a valinu (A262V), podmíněný nukleotidy C a T, a na pozici 296 alternují AK valin a izoleucin (V296I) a nukleotidy G a A. Změny na těchto třech pozicích vyúsťují ve dva hlavní haplotypy – PAV (prolin, alanin, valin) a AVI (alanin, valin, izoleucin). Dominantnímu haplotypu PAV je připisován fenotyp senzitivity k PTC, tzv. chutnačství. Recesivnímu haplotypu AVI je naopak připisováno tzv. nechutnačství PTC (Kim et al., 2003).

Kombinace tří hlavních SNPs v genu *TAS2R38* mohou vyústit v osm různých haplotypů. Nejznámější jsou výše zmíněné haplotypy PAV a AVI. Mezi další patří haplotypy AAV (alanin, alanin, valin), AAI (alanin, alanin, izoleucin) a PVI (prolin, valin, izoleucin), které vznikly pravděpodobně rekombinací majoritních haplotypů (Kim et al., 2003). Pozorovány byly také zbývající minoritní haplotypy PAI (prolin, alanin, izoleucin), AVV (alanin, valin, valin) a PVV (prolin, valin, valin), ale pouze ve velmi nízkých frekvencích (Carrai et al., 2011; Pemberton et al., 2008; Risso et al., 2016).

Spolu s těmito třemi SNPs bývají v literatuře občas zmiňovány také dva SNPs, které způsobují záměny AK na pozicích 80 a 274, respektive nukleotidových pozicích 239 a 820 (Campbell et al., 2012; Desai et al., 2011). Ty podmiňují dva tzv. subhaplotypy příbuzné k AAI – ARARI (alanin, arginin, alanin, arginin, izoleucin) a AHACI (alanin, histidin, alanin, cystein, izoleucin). Jak můžeme vidět, na pozici 80 se může vyskytovat AK arginin nebo histidin a nukleotidy A a G. Na pozici 274 alternují nukleotidy C a T a AK arginin a cystein. U všech předem zmíněných haplotypů podmíněných třemi základními SNPs se na pozici 80 vyskytuje AK histidin a na pozici 274 AK arginin (Drayna, 2005).

Zbýlé SNPs se vyskytují na AK pozicích 6, 31, 36, 64, 121, 123, 135, 139, 190, 217, 235, 268, 270, 274, 275 a 311. Můžeme si všimnout, že na AK pozici 274 lze najít jak výše zmíněný polymorfismus podmiňující haplotypy ARARI a AHACI, tak i SNP na nukleotidové pozici 822. Ten patří spolu s polymorfismem na AK pozici 31 ke dvěma SNPs, u kterých dochází pouze k synonymním záměnám AK. Na těchto pozicích se stále vyskytují AK arginin,

respektive leucin, které však mohou být kódovány více různými nukleotidovými triplety (Campbell et al., 2012).

Podle Campbella et al. (2012) podmiňuje všech 21 SNPs celkem 21 haplotypů, z nichž se většina vyskytuje převážně u afrických populací. Kromě hlavních haplotypů s častějším výskytem, jako jsou PAV, AVI, AAI a AAV, a výše zmíněných subhaplotypů ARARI a AHACI se do tohoto výčtu řadí i dalších pět subhaplotypů PAV, šest subhaplotypů AVI a čtyři subhaplotypy AAI (Campbell et al., 2012). Haplotypů genu *TAS2R38* se ale na světě vyskytuje pravděpodobně mnohem více. V různých výzkumech už byly pozorovány také haplotypy PVI, PAI, AVV a PVV (Carrai et al., 2011; Kim et al., 2003; Pemberton et al., 2008; Risso et al., 2016), které do tohoto výčtu 21 haplotypů řazeny nejsou, a proto zůstává finální počet možných haplotypů v tomto genu nejasný.

## 7.1 Varianty a haplotypy genu *TAS2R38*

### 7.1.1 Fenotypové projevy haplotypů a jejich rozložení ve světě

Jak již bylo uvedeno, PAV je majoritním haplotypem chutnačství PTC, zatímco AVI je majoritním haplotypem nechutnačství. Lidé s heterozygotní sestavou těchto haplotypů, tedy PAV/AVI, jsou k PTC senzitivní také, ale méně než homozygoti PAV/PAV (Kim et al., 2003). Obdobně je tomu i u genotypů PAV/AAV a PAV/AAI (Campbell et al., 2012). Střední citlivost k PTC mají homozygoti minoritních haplotypů AAV, AAI a PVI (Bufe et al., 2005), stejně tak jako lidé se sestavou haplotypů AVI/AAV a AVI/AAI (Campbell et al., 2012).

Další dva minoritní haplotypy, PAI a AVV, odpovídají k PTC podobně jako haplotypy PAV a AVI. Vidíme tedy, že na senzitivitu mají větší vliv AK na pozicích 49 a 262, než AK na pozici 296 (Bufe et al., 2005). Pozdější výzkumy tuto představu ale popírají a uvádějí, že varianta na pozici 296 je z funkčního hlediska také důležitá, zejména *in vivo* (Campbell et al., 2012). To podporuje i výzkum Mennelly et al. (2011), který ukazuje, že tato varianta je spojovaná se zvýšenou senzitivitou k nízkým koncentracím PROP, což je sloučenina chemicky podobná PTC, jak již bylo uvedeno výše.

Poslední z třetice haplotypů s nízkou frekvencí výskytu je PVV, o jehož citlivosti k PTC se moc neví. Je pouze známo, že lidé s genotypem PAV/PVV jsou k PTC citliví obdobně jako homozygoti PAV/PAV (Carrai et al., 2011). Dva subhaplotypy ARARI a AHACI jsou zatím bez známého fenotypového projevu (Desai et al., 2011), i když už byla naznačena i možnost, že by varianty na ostatních nukleotidových pozicích podmiňující zbylé subhaplotypy mohly mít na senzitivitu k PTC určitý vliv (Campbell et al., 2012).

Majoritní haplotypy PAV a AVI se u všech doposud zkoumaných populací vyskytují v průměru ve frekvencích přibližně 50,8 % a 42,7 % a tvoří tak převážnou většinu haplotypů *TAS2R38*. Nižší zastoupení můžeme pozorovat pouze u haplotypu AVI, a to u afrických a amerických populací, kde se jeho frekvence pohybují kolem 30 % (Risso et al., 2016). V Americe to můžeme vysvětlit 100 % výskytem homozygotního genotypu PAV/PAV u jihozápadní populace původních obyvatel Ameriky (Kim et al., 2003), zatímco v Africe bude mít na nižší zastoupení haplotypu AVI podíl větší genová a nukleotidová diverzita (Risso et al., 2016).

V Africe totiž pozorujeme kromě haplotypů PAV a AVI i výskyt haplotypu AAI, a to ve frekvencích mezi 7 a 33 %. Nejčastějším genotypem je v tomto případě PAV/AAI, jehož výskyt může dosahovat až 100 %. Ve frekvencích od 3 do 17 % zde najdeme také homozygoty AAI/AAI, ale pouze v subtropických oblastech (Risso et al., 2016). Dále se v Africe můžeme setkat s málo frekventovaným haplotypem AAV a mnoha subhaplotypy PAV, AVI a AAI, které jsou podmíněny mutacemi v některých z dalších 18 SNPs v kódující oblasti genu *TAS2R38*. Ty se zde vyskytují ve frekvencích kolem 10 %, ale ve frekvenci 4,5 % je pozorujeme i v oblastech mimo Afriku (Campbell et al., 2012).

Haplotyp AAI se objevuje ve velmi nízkých frekvencích také u populací Blízkého východu a středu jižní Itálie (Risso et al., 2016). Naopak haplotyp AAV nacházíme kromě Afriky zejména v Evropě (Kim et al., 2003). Právě tyto dva haplotypy následují se svými průměrnými frekvencemi výskytu cca 3,4 % a 2,5 % po majoritních haplotypech PAV a AVI. U zbylých haplotypů můžeme pozorovat výskyt pouze ve velmi nízkých frekvencích (Risso et al., 2016), jak je patrné v tabulce č. 4.

**Tabulka 4.** Distribuce *TAS2R38* haplotypů v populacích

Populace	PAV	AVI	AAV	AAI	PVI	PAI	AVV	PVV
všechny	50,76 %	42,70 %	2,48 %	3,39 %	0,07 %	0,18 %	0,32 %	0,10 %
africké	50,76 %	35,18 %	0,61 %	13,22 %	0,15 %	0,00 %	0,08 %	0,00 %
asijské	64,51 %	35,31 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,17 %	0,00 %
evropské	45,66 %	49,22 %	3,56 %	0,55 %	0,03 %	0,32 %	0,49 %	0,17 %
americké	68,61 %	26,69 %	2,26 %	2,26 %	0,19 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

(převzato a upraveno podle Risso et al., 2016)

Co se týče fenotypového projevu senzitivity k PTC, můžeme obecně u všech lidských populací pozorovat bimodální distribuci fenotypů (Fox, 1932), tedy rozdělení jedinců na tzv. chutnače a nechutnače. V Africe je tomu ale jinak, jelikož se zde vyskytují jak haplotypy PAV a AVI, tak i haplotypy se střední citlivostí k PTC, tedy AAV a AAI. Distribuce fenotypů hořké chuti je zde tedy spíše unimodální (Campbell et al., 2012).

### 7.1.2 Souvislost se stravou

Receptory kódované genem *TAS2R38* zprostředkovávají reakce na látky obsahující thiokyanátovou skupinu (Bufe et al., 2005). PTC je sice syntetická látka, která prozatím nebyla nalezena v přírodě, ale existuje mnoho přírodních strukturně podobných látek, na které receptor *TAS2R38* odpovídá také (Meyerhof et al., 2010); viz. tabulka č. 2.

Například glukosinoláty jsou široce rozšířeny u různých druhů rostlin, zejména u brukvovitých (*Brassicaceae*). Sem patří například brokolice, růžičková kapusta, květák, kapusta, kedlubna nebo brukev (Carlson et al., 1987). Rozkladem glukosinolátů vznikají izothiokyanáty, které působí jako strumigenní látky, jinak známé také jako goitrogeny (Fenwick et al., 1983). Ty interferují s příjmem jódu štítnou žlázou a ve vysokém množství mohou způsobit vznik strumy. Projevy přetížení goitrogeny se projevují zejména v oblastech světa s nízkým zastoupením jódu v půdě a vysokým příjmem glukosinolátů v potravě. V místech, kde se praktikuje jodizace soli, je jód zastoupen v hojném množství, a proto

k přetížení goitrogeny nedochází (Greene, 1974). I přesto by zde mohly mít glukosinoláty jisté nutriční důsledky, jelikož vykazují určité protirakovinné vlastnosti (Fahey et al., 1997).

Strava bohatá na ovoce a zejména na brukvovitou a listovou zeleninu bývá často spojována s nižším výskytem rakoviny (Murillo & Mehta, 2001). Příjem tohoto typu stravy ale zůstává stále velice nízký i přes mnohá doporučení různých odborníků (Guenther et al., 2006). Předpokládá se totiž, že chutnači PTC nosící haplotyp PAV, kteří oproti nechutnačům nepřijímají tolik přirozeně se vyskytujících goitrogenů, jsou lépe chráněni před požitím nadměrného množství těchto látek, zejména kvůli jejich hořké chuti (Greene, 1974). Homozygotům PAV/PAV připadá zelenina obsahující glukosinoláty až o 60 % více hořká než homozygotům AVI/AVI. Naopak zeleninu, která glukosinoláty neobsahuje, hodnotí jak chutnači, tak nechutnači jako stejně hořkou (Sandell & Breslin, 2006). Schopnost hořké chuti se tedy pravděpodobně vyvinula jako ochrana před požitím hořce chutnajícími toxických látek obsažených v rostlinách (Wooding et al., 2004).

Na základě toho, že receptory TAS2R38 tak úzce souvisí se stravou, a že jsou v Africe pozorovatelné různé lokální adaptace v reakci na typ stravy (Tishkoff et al., 2007), byla vyslovena hypotéza, že by africké populace, které upřednostňují rozdílné druhy subsistence (lovci-sběrači, pastevci a zemědělci), mohli mít v genomu zastoupeny různé frekvence genetických variant genu *TAS2R38* zejména kvůli selekčnímu tlaku způsobenému odlišnými typy stravy (Campbell et al., 2012). Tato teorie ale nebyla potvrzena. Naopak byly u těchto populací pozorovány podobné haplotypové frekvence (Campbell et al., 2012).

### 7.1.3 Působení přírodního výběru

Jak bylo zmíněno výše, schopnost vnímat hořkou chuť se mohla vyvinout jako ochrana před požitím hořce chutnajícími toxických látek obsažených v rostlinách (Wooding et al., 2004). Pokud by tato schopnost byla důležitá pro reprodukční zdatnost (*fitness*), dalo by se předpokládat, že by selekční tlak udržoval haplotyp PAV ve vysokých frekvencích a z populace by byl naopak vyselektován nefunkční haplotyp AVI (Tepper, 2008). S tímto tvrzením je ale v rozporu vysoká frekvence (42,7 %) nechutnačů s AVI haplotypem ve světě (Risso et al., 2016).



Jako určité vysvětlení udržení fenotypových variant v percepci PTC byla navržena balancující selekce, která by mohla upřednostňovat heterozygoty (Fisher et al., 1939). Ta udržuje v populaci současně dvě nebo více forem genu. Často se tomu tak děje například u mutací, které jsou škodlivé v homozygotní sestavě. Klasickým příkladem je alela způsobující srpkovitou anémií, která v oblastech s výskytem endemické malárie chrání před tímto infekčním onemocněním v heterozygotním stavu. Homozygoti s alelou pro srpkovitou anémií se nedožijí dospělosti vzhledem k tomuto onemocnění a homozygoti bez alely pro srpkovitou anémií trpí malárií, na kterou se umírá zejména v dětském věku. Daná mutace je tedy v populaci udržována balancující selekcí v heterozygotním stavu, který je pro organismus v daném prostředí prospěšný (Drayna, 2005; Haldane, 1949).

Tento model byl podpořen až roku 2004, a to díky objevu genu *TAS2R38*, který odpovídá přibližně za 75 % fenotypových variant ve vnímání PTC (Kim et al., 2003). Analýzou molekulárně genetických dat bylo potvrzeno, že se na udržení alel chutnačství a nechutnačství v populaci podílela balancující selekce, i když konkrétní mechanismus, kterým by tato selekce působila, zatím objasněn nebyl (Wooding et al., 2004). Je ale třeba doplnit, že gen *TAS2R38* dosáhl v tomto výzkumu statisticky signifikantních hodnot ukazujících na balancující selekci pouze za předpokladu populační expanze (Wooding et al., 2004).

Následný výzkum použil tento model k výpočtu hodnot Tajimova testu selekční neutrality pro šest selekčně neutrálních lokusů. U pěti z nich dosáhly výsledné hodnoty statistické signifikance, což autoři připisují tomu, že použití modelu populační expanze vede k falešně pozitivním výsledkům, které značí balancující selekci (Wang et al., 2004).

Zároveň tito autoři zaznamenali relaxaci selekčních sil působících na gen *TAS2R38*. Počátek této relaxace datují do doby před 0,75 milióny let (0,1 až 2,6 milióny let) a zároveň uvádějí, že neúplná funkční relaxace tohoto genu započala už u předků lidí a šimpanzů a byla následována druhou silnější vlnou v linii hominidů (Wang et al., 2004).

I přes to, že výše uvedená doba relaxace má velké rozpětí, je zajímavé, že koliduje s obdobím počátku využívání ohně před 0,8 milióny let (Goren-Inbar et al., 2004). Možnost využití ohně při přípravě potravin měla za následek snížení závislosti na *TAS2R* receptorech pro detekci hořkých toxických látek, jelikož díky tepelné úpravě jsou z velké míry jedovaté

potravinu detoxifikovány (Stahl et al., 1984). Zároveň tím byl umocněn i vliv změny stravy, která proběhla před 2 milióny let. V té době se zvýšil příjem masa a naopak snížil příjem rostlinné stravy (Leonard, 2003), což snížilo množství toxických látek, se kterými homininé přišli do styku. Relaxaci selekčních sil v tomto genu můžeme pozorovat i u šimpanzů, i když v menší míře (Wang et al., 2004). Souviset to může opět se stravou, jelikož u šimpanzů je doložená jen částečná konzumace masa, zatímco v jídelníčku jiných lidoopů jako jsou gorily a orangutani masitou stravu nenajdeme (Milton, 2003).

Relaxaci selekčních sil v genu *TAS2R38* pozoroval i další výzkum, ve kterém autoři navrhli, že by balancující selekce, která udržovala haplotypy PAV a AVI v přibližně stejných frekvencích, působila v prvotních stádiích vývoje homininů, ještě před kolonizací Eurasie (Risso et al., 2016). U haplotypu AVI připisují autoři jeho současnou distribuci u neafrických populací demografickým a populačně stratifikačním procesům, čemuž odpovídají i vysoké frekvence PAV a AVI haplotypů mimo Afriku vzniklé pravděpodobně sérií efektů hrdla láhve a populačních expanzí za současné relaxace selekčních sil působících na tento gen (Risso et al., 2016).

Další výzkum, který naopak podpořil působení balancující selekce na gen *TAS2R38*, opět pozoroval statisticky signifikantní hodnoty pouze za předpokladu mírného populačního růstu (Campbell et al., 2012). Tito autoři model balancující selekce dále rozvádějí, jelikož v rámci subsaharské Afriky jsou kromě majoritních haplotypů ve vyšších frekvencích zastoupeny i jiné haplotypy (Risso et al., 2016). Vznik hlavních SNPs i méně častých nesynonymních variant v genu *TAS2R38* začal být připisován komplexnímu modelu selekce, který zahrnuje jak starší balancující selekci, tak i mladší rozrůžňující selekci. Tento nedávný selekční tlak v Africe upřednostnil zvýšení počtu nesynonymních mutací majoritních haplotypů PAV, AVI a AAI, které byly udržovány balancující selekcí nezávislou na typu stravy (Campbell et al., 2012). Konkrétně u haplotypu AAI bylo navrženo, že podstoupil jak balancující selekci působící na haplotypy PAV a AVI, tak i slabou direkcionální selekci (Risso et al., 2016). To naznačuje, že v Africe mají méně časté varianty genu *TAS2R38* jinou selekční historii a zároveň komplexnější evoluční historii než ty mimo Afriku (Campbell et al., 2012; Risso et al., 2016).

Model balancující selekce nevylučuje působení dalších selekčních sil. Je možné, že jako první působila pozitivní selekce, která mohla vést ke vzestupu frekvence haplotypu AVI, jenž by byl následně udržován balancující selekcí, nebo k upřednostnění konkrétních alel genu *TAS2R38* v určitém prostředí, což by vedlo k lokální adaptaci (Wooding et al., 2004). Model do dnešní doby stále nebyl plně podpořen, ale i přesto se zdá, že balancující selekce měla na gen *TAS2R38* v evoluci určitý vliv, i když v současné době už na něj pravděpodobně nepůsobí a dochází k její relaxaci.

Stále ale nemáme odpověď na to, jak se nechutnači s AVI haplotypem udrželi v populaci v tak vysokých frekvencích i přesto, že neměli žádnou výhodu proti požití toxických hořkých substancí. Udržení se připisuje tomu, že by haplotyp AVI mohl kódovat funkční receptor pro zatím neidentifikovanou toxickou hořkou substancí. Je totiž možné, že heterozygoti genu *TAS2R38* získávají výhodu díky tomu, že dokáží rozpoznat, a na základě toho se vyhnout, širšímu spektru hořkých toxických látek než homozygoti (Wooding et al., 2004). Tato myšlenka vychází z toho, že gen *TAS2R38* neobsahuje žádné stop kodony nebo delece, které by zapříčinily nefunkčnost alely (Kim et al., 2003). Zároveň ji podporuje i poznatek, že haplotyp AVI je stejně jako haplotyp PAV plně exprimován na RNA rovině (Bufe et al., 2005). Risso et al. (2016) dále uvádějí, že by oba majoritní haplotypy mohly být podstatné pro detekci potenciálně hořkých toxických substancí, které můžeme najít pouze na africkém kontinentě.

Jako jedna z možných hořkých látek odpovídající na AVI receptor byla navržena šťáva plodů ze stromu *Antidesma bunius* původem z jihovýchodní Asie a severní Austrálie. Právě u ní je totiž percepce hořké chuti naprosto opačná než u PTC, jelikož lidé, kteří ji cítí jako velmi hořkou, nesou alespoň jednu alelu nechutnačství (Risso et al., 2018). Na základě toho, že ne všichni nositelé AVI haplotypu byli schopni detekovat hořkost této rostliny, autoři shrnují, že AVI haplotyp je pro tuto percepci sice nezbytný, ale je nutné zahrnout i jiné variabilní faktory, které mají na percepci také podíl, například rozdíly ve složení slin. Jako další kandidátní faktor byly navrženy rozdíly v jiných genech kódujících receptory hořké či sladké chuti, což ale autoři s největší pravděpodobností vylučují (Risso et al., 2018).

#### 7.1.4 Evoluce haplotypů

Původní představa balancující selekce byla vystavěna na zjištění, že se mezi šimpanzi vyskytuje přibližně stejný poměr chutnačů vůči nechutnačům jako v lidských populacích. Jako vysvětlení bylo navrženo, že lidé a šimpanzi sdílí alely chutnačství a nechutnačství, které vznikly ještě před oddělením těchto dvou linií, a od té doby se udržovaly v rovnováze právě díky balancující selekci, konkrétně pak výhodě heterozygotů (Fisher et al., 1939).

U šimpanzů se v genu *TAS2R38* nachází sedm SNPs (Wooding et al., 2006). Žádný z nich ale neodpovídá nukleotidovým pozicím, které se vyskytují v tomto genu u člověka. Zajímavý je zejména polymorfismus na druhé pozici iniciačního kodónu (ATG), kde dochází k záměně T za G (AGG). Pokud k této záměně dojde, je translace tohoto genu potlačena a má se tedy za to, že haplotypy obsahující variantu AGG jsou šimpanzími alelami nechutnačství (Wooding et al., 2006).

Lidé a šimpanzi tedy sice sdílí senzitivitu k hořkým sloučeninám zprostředkovanou variantami *TAS2R38* receptoru, ale nikoli polymorfismy, které ji zapříčiňují, jak navrhovala původní hypotéza Fishera et al. (1939). Varianty vznikly u každého z těchto druhů samostatně po jejich oddělení před 5 až 6 milióny let. Alely nechutnačství jsou u každého druhu nezávisle evolučně odvozené z ancestrálních alel chutnačství (Wooding et al., 2006). Dle mého názoru by tato skutečnost mohla být způsobena tím, že haplotyp PAV přinášel už v minulosti výhodu, zatímco haplotyp AVI začal být výhodný až po oddělení těchto linií.

Pozdější výzkum Campbella et al. (2012) tento odhad zpřesňuje a původ variant genu *TAS2R38* spojených s citlivostí k PTC datuje do doby před vznikem anatomicky moderního člověka. Tyto varianty tedy vznikly v linii rodu *Homo*, ale ještě před vznikem *Homo sapiens*, jak naznačuje i výskyt haplotypů v různých lidských populacích (Campbell et al., 2012). To podporuje i nález varianty P49A u neandertálské populace, který ukazuje, že tento polymorfismus byl přítomný u společného předka neandertálců a moderních lidí (Lalueza-Fox et al., 2009). Průměrné stáří polymorfismů na AK pozicích 49, 262 a 296 je  $1,3 \pm 242\,211$  miliónů let,  $0,336 \pm 89\,845$  let a  $1,0 \pm 267\,268$  miliónů let, respektive. Méně časté varianty jsou mnohem mladší, objevují se poprvé až v posledních 200 000 letech (Campbell et al., 2012).

## 8 Materiál

Praktická část mojí diplomové práce je založena na materiálu 147 vzorků sesbíraných během expedice vedené prof. Mgr. Viktorem Černým, Dr. a Mgr. Martinou Čížkovou, Ph.D. v roce 2019 v Mauritanii, konkrétně v oblastech Gorgol a Assaba na jihu země (obrázek č. 2). Jde o vzorky slin sbírané pomocí kitů OG-500 Oragene (DNA Genotek), které byly získány od tří populací – Maurů (n=49), Soninků (n=51) a Fulbů (n=47); doplňující informace k těmto skupinám viz příloha č. 2. Spolu s těmito vzorky byla u stejných jedinců zjištěna i senzitivita k hořké chuti PTC. Sběr probíhal pomocí testovacích papírků od firmy Findel, které si lidé dávali na zhruba 10 až 20 vteřin na jazyk a následně odpovídali na dotaz, zda cítí nebo necítí nějakou chuť. Tyto papírky jsou zdravotně nezávadné a obsahují méně než 0,02 % PTC. Citlivost k PTC byla hodnocena na škále hořkosti od 0 (žádná citlivost k PTC) do 2 (vysoká citlivost k PTC).



**Obr. 2.** Lokalizace sběrných míst vzorků v Mauritanii (převzato a upraveno podle Wikimedia Commons)

## 9 Metody

Laboratorní část této diplomové práce proběhla v archeogenetické laboratoři Archeologického ústavu AV ČR, Praha, v.v.i. Sekvence vzorků DNA byla provedena firmou MacroGen Europe v Amsterdamu. Obdržená data (chromatogramy) byla následně opět zpracována v archeogenetické laboratoři.

### 9.1 Izolace DNA

Izolace DNA je prvním krokem k získání genetických dat z biologického materiálu (v mém případě ze slin). Jde rovněž o odstranění příměsí a nečistot, které by mohly inhibovat následující analýzy, především polymerázovou řetězovou reakci (viz dále). V této práci byly použity vzorky slin uchované v komerčních roztocích Oragene, z nichž byla vyizolovaná DNA pomocí Oragene®•DNA izolačního kitu od firmy DNA Genotek, a to již v rámci předchozích výzkumných projektů archeogenetické laboratoře AV ČR v Praze. Jednotlivé kroky izolace se skládají z inkubace, purifikace (přečištění), centrifugace, srážení pomocí ethanolu a vortexování. Celý izolační protokol je uveden v příloze č. 3.

### 9.2 Amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězové reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je jednou z nejdůležitějších molekulárně-genetických metod sloužících k amplifikaci námi studovaného úseku DNA. Podstatou je namnožení úseku DNA ohraničeného dvěma oligonukleotidovými řetězci, tzv. primery (*forward* a *reverse*). Celá reakce probíhá v termocycleru v reakční směsi složené z Taq DNA polymerázy, deoxynukleosidtrifosfátů (dNTPs), reakčních pufrů, vody a chloridu hořečnatého ( $MgCl_2$ ). Metoda je souborem tří opakujících se kroků, z nichž každý je charakterizován určitou délkou a teplotou odpovídající vlastnostem dané DNA a použitých chemikálií. Prvním krokem je oddělení vláken DNA, tzv. denaturace templátu, probíhající při teplotách kolem 94 °C. Další částí je tzv. hybridizace (nasedání specifických primerů), po které následuje syntéza DNA, tzv. elongace, za teploty 72 °C pomocí Taq DNA polymerázy izolované z bakterie *Thermus aquaticus*, která je odolná vůči vysokým teplotám. Teplota pro nasedání primerů

je kritickým krokem reakce, jelikož je specifická pro daný pár primerů a je nutné ji kalibrovat. Celá PCR tedy probíhá následovně – prvním krokem je denaturace, po které následuje několik (25-40) opakování tří výše zmíněných kroků; celá reakce je ukončena ještě jedním cyklem elongace.

V této práci byly použity vyizolované vzorky DNA, reakční směs GoTaq Green Master Mix od firmy Promega, deionizovaná voda a tři páry primerů (*forward* a *reverse*). Všechny primery byly navrženy Mgr. Martinou Čížkovou, Ph.D. pomocí softwaru OligoPerfect od firmy Thermo Fisher Scientific. Seznam primerů, jejich sekvence a teploty hybridizace i délky finálních produktů jsou uvedeny v příloze č. 4. Postup amplifikace DNA pomocí PCR je uveden v příloze č. 5.

Program cyklů termocycleru Eppendorf Mastercycler použitý v práci:

1x	94 °C	1 minuta
35x	94 °C	30 sekund
	57 °C	25 sekund
	68 °C	30 sekund
1x	72 °C	5 minut

### 9.3 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je nejpoužívanější separační metodou při práci s amplifikovanými fragmenty DNA. Je založena na jejich rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli. Nukleové kyseliny v gelu putují díky svému zápornému náboji ke kladnému pólu, anodě. Současně se jednotlivé fragmenty rozdělují podle délky – kratší putují rychleji, delší naopak pomaleji, takže zůstávají v blízkosti jamek. Po zastavení napětí je DNA v gelu vizualizována a konkrétní délky fragmentů jsou odečteny pomocí tzv. žebříčků, které obsahují fragmenty DNA známé délky.

Tato metoda byla použita nejen jako kontrola PCR reakce, ale také ke kvantifikaci k následnému ředění koncentrace (viz dále). Konkrétně bylo v této práci použito 60 ml 1,5% agarózového gelu vytvořeného z 0,8 g agarózy, 12 g tris-borátového pufru (TBE) a vody.

Po zahřátí v mikrovlnné troubě po dobu cca 2 minut byly do gelu následně přidány 3  $\mu\text{l}$  barviva GelRed sloužícího k vizualizaci amplikonů DNA a gel ztuhlý v elektroforetické vaničce byl zalit pufrům TBE. Do jamek v gelu byl přenesen vždy 1  $\mu\text{l}$  PCR produktu, 1  $\mu\text{l}$  negativní kontroly a 10  $\mu\text{l}$  žebříčku GeneRuler 50 bp DNA Ladder naředěného v poměru 1:1 s vodou. Elektroforéza běžela po dobu asi 50 minut pod napětím 87 V. Fragmenty DNA byly následně vizualizovány UV světlem. Zároveň byla pořízena fotografie, ze které se pomocí programu SynGene odečítaly konkrétní délky a koncentrace fragmentů. Současně byla kontrolována i negativní kontrola.

## 9.4 Sekvenace DNA

Sekvenace slouží k určení přesného pořadí nukleotidů (sekvence) v DNA. V této práci bylo použito Sangerovo sekvenování, známé také jako dideoxy metoda.

Pro sekvenování bylo nutné naředit získané PCR produkty na stejnou koncentraci 40 ng/ $\mu\text{l}$ . Vzorky byly proto přeneseny do 96 jamkové destičky a smíchány s patřičným množstvím destilované vody. Následně byly naředěny i *forward* primery, a to na výslednou koncentraci 5pmol. Připravené vzorky byly poté spolu s primery odeslány na sekvenaci do firmy Macrogen Europe v Nizozemsku. Výsledky byly obdrženy ve formě chromatogramů v elektronické podobě.

Z důvodu špatné čitelnosti některých úseků chromatogramů bylo následně celkem 38 vzorků sekvenováno v konkrétních úsecích i pomocí *reverse* primeru. Primerem A byly sekvenovány vzorky MOO18, SNK06, SNK15 a SNK42, primerem B všech zbylých 34 vzorků (MOO05, 12, 28, 29, 30, 31, 32, 35, 36, 37, 38, 42, 44, 47, SNK02, 03, 05, 09, 13, 15, 17, 18, 19, 20, 26, 27, 31, 34, 37, 38, 41, 45, 49 a FMA14). Vzorky byly opět naředěny na koncentraci 40 ng/ $\mu\text{l}$  a společně s *reverse* primery (koncentrace 5pmol) odeslány na sekvenaci. Výsledky byly obdrženy opět v elektronické podobě ve formě chromatogramů.



## 9.5 Zpracování dat

Z důvodu absence vzorků na elektroforéze (inhibice PCR) i po opakované izolaci bylo z dalšího zpracování vyřazeno šest vzorků (MOO02, MOO06, MOO25, SNK14, SNK30 a FMA16). Výsledný soubor tedy obsahoval celkem 141 vzorků, konkrétně 46 Maurů (MOO), 49 Soninků (SNK) a 46 Fulbů (FMA).

### 9.5.1 Složení a zarovnání sekvencí DNA

Jelikož se každá jednotlivá sekvence skládala ze tří částí kvůli použití tří párů primerů, musely být v prvním kroku zpracování dat získané sekvence složeny. Následně byly všechny sekvence zarovnány k referenční sekvenci genu *TAS2R38*. Použita byla sekvence NC\_000007.14 z databáze GenBank<sup>®</sup> (Clark et al., 2016), konkrétně pouze sekvence exonu genu *TAS2R38* o délce 1002 bp, která je uvedena v příloze č. 6. Tato sekvence byla vybrána, jelikož je v databázi označena jako referenční pro tento gen. Oba tyto kroky (složení sekvencí a jejich zarovnání k referenční sekvenci) byly provedeny v programu Geneious Prime verze 2021.2.2 (<https://www.geneious.com>, Kearse et al., 2012).

### 9.5.2 Fázování

Jelikož byly získány diploidní sekvence, bylo pro následné analýzy nutné provést fázování (rekonstruovat haplotypy) a rozdělit u každého vzorku (genotypu) mutace do dvou sekvencí (haplotypů), jako je tomu v buňkách daných jedinců. Nejprve byly mutace náhodně rozděleny pomocí programu DNA Sequence Polymorphism (DnaSP) verze 6.12.03 (Rozas et al., 2017). V tomto kroku byly z DnaSP získány synonymní a nesynonymní mutace, které byly dále použity k výpočtu jejich frekvencí u jednotlivých populací. Následně byly pomocí programu Fabox verze 1.6 (Villesen, 2007) ze sekvencí extrahovány pouze mutované pozice. Tato data byla použita k vytvoření vstupního souboru do programu Arlequin verze 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010), ve kterém byly mutace do sekvencí rozděleny statisticky. Toto rozdělení probíhalo pomocí Expectation-Maximization (EM) algoritmu (Excoffier & Slatkin, 1995).

Protože u 35 sekvencí (tři sekvence z populace Maurů, 21 Soninků a 11 Fulbů) vyšly dvě rozdílné dvojice možných haplotypů, bylo provedeno kontrolní fázování v programu DnaSP (Rozas et al., 2017), který používá fázování v programu PHASE verze 2.1. (Stephens & Scheet, 2005; Stephens et al., 2001). Pro toto fázování byla použita původní sada diploidních sekvencí, ze kterých byly opět pomocí programu Fabox (Villesen, 2007) extrahovány pouze mutované pozice. Následně byla data z obou programů vzájemně porovnána. Haplotypy zfázované v DnaSP odpovídaly haplotypovým dvojicím s vyšší frekvencí z Arlequinu a pro další analýzy byly proto použity právě tyto.

EM algoritmus odhaduje haplotypové frekvence v populaci s co největší pravděpodobností pomocí dvou opakujících se kroků. V prvním kroku jsou vypočítány očekávané genotypové frekvence za předpokladu Hardyho-Weinbergovy rovnováhy. Následně jsou tyto relativní genotypové frekvence použity k odhadu haplotypových frekvencí pomocí metody počítání genů (Excoffier & Slatkin, 1995). Fázování v programu PHASE používá k odvození haplotypů Bayesovu metodu založenou na koalescenci. V prvním kroku je náhodně přiřazena gametická fáze ke každému z vzorků. Poté následuje sled několika opakujících se kroků. Nejprve je náhodně vybrán jeden ze vzorků, u kterého jsou následně odhadovány haplotypy za předpokladu, že všechny ostatní haplotypy v daném vzorku jsou rekonstruovány správně (Stephens et al., 2001).

### 9.5.3 *Vztahy mezi haplotypy*

K reprezentaci fylogenetických vztahů mezi haplotypy byla použita metoda *median joining* (Bandelt et al., 1999), pomocí které byla v programu Population Analysis with Reticulate Trees (PopART) verze 1.7 (Leigh & Bryant, 2015) vytvořena fylogenetická síť. V síti byla použita rovněž sekvence genu *TAS2R38* od šimpanze učenlivého *Pan troglodytes*, konkrétně JQ272199.1 z databáze GenBank® (Clark et al., 2016). Z důvodu většího množství retikulací byla pro porovnání sestavena fylogenetická síť i v programu Network verze 10.2, opět za použití *median joining* (Bandelt et al., 1999). V tomto programu je totiž možné nastavit váhu rekurentních mutací. Nejprve byla u všech mutací ponechána přednastavená hodnota 10. V rámci mnou pozorovaných mutací se častěji vyskytovaly mutace na nukleotidových pozicích 145, 785 a 886, a proto u nich byly váhy následně sníženy

na 5 a poté i na 1. Všechny vzniklé fylogenetické sítě se nicméně shodovaly s tou vytvořenou v programu PopART a dále je tedy uváděna pouze ona.

#### 9.5.4 Korelace genotyp/fenotyp

Korelace genotypu a fenotypu byla provedena pomocí Kruskal-Wallisova testu (Kruskal & Wallis, 1952), známého také jako jednofaktorová neparametrická analýza rozptylu, který byl za stejným účelem použit i ve studii Campbella et al. (2012). Tento test byl realizován v programu R Commander verze 2.7-2 (Fox, 2005). V rámci něj jsou testovány dvě hypotézy. Nulová hypotéza říká, že mediány všech skupin jsou stejné, alternativní hypotéza naopak uvádí, že alespoň jeden medián některé skupiny se liší od mediánů dalších skupin. Alternativní hypotézu přijímáme v případě, že  $p$ -hodnota ( $p$ ) tohoto testu je nižší než statistická významnost 5 % (Kruskal & Wallis, 1952). Test byl proveden celkem dvakrát.

V obou případech byly k vytvoření skupin použity genotypy. Jako testovaná proměnná byla u prvního testu vložena skóre citlivosti k PTC na škále od 0 (žádná citlivost k PTC) do 2 (vysoká citlivost k PTC) a ve druhém případě skóre citlivosti k PTC upravená k věku a pohlaví na základě vzorce:  $n + [(a - a_M)/20] - 0,146673_{ženy}$ , kde  $n$  značí skóre PTC,  $a$  věk daného jedince a  $a_M$  průměrný věk jedinců ve zkoumaném souboru. Obdobná rovnice byla za stejným účelem použita i ve studii Campbella et al. (2012). Hodnota 0,146673 byla u žen odečítána, jelikož v mnou zkoumaném souboru byly ženy v průměru o tuto hladinu citlivější k PTC než muži. Stále je možné, že jsou v mém souboru zastoupeny pouze ženy, které jsou k PTC citlivější, než jiné ženy žijící v Mauritánii, případně ve světě. Jelikož ale neexistuje žádná studie, která by používala stejnou metodu testování citlivosti k PTC jako má práce, nelze ověřit, zda je tato odečítaná hodnota platná i v obecném měřítku. Tento výpočet je tedy použit za předpokladu, že je v mé práci zkoumán náhodný soubor žen a mužů, u kterých k tomuto zkreslení dat nedochází.

#### 9.5.5 Intrapopulační a interpopulační analýzy

Intrapopulační analýzy byly provedeny v programu Arlequin (Excoffier & Lischer, 2010). Zahrnovaly zjištění jak standardních genetických indexů, jako je genová diverzita ( $h$ ) (Nei,

1987), počet polymorfních míst a počet haplotypů, tak i molekulárních genetických indexů jako je nukleotidová diverzita ( $\pi$ ) (Nei, 1987; Tajima, 1983) a průměrný počet párových rozdílů ( $D_{ii}$ ) (Tajima, 1983, 1993). V tomto programu byly na interpopulační úrovni hodnoceny také genetické vzdálenosti populací. K jejich odhadu byla použita Reynoldsova matice genetických vzdáleností (Reynolds et al., 1983) za předpokladu Kimurova modelu dvou parametrů (Kimura, 1980) s gama korekcí 0,4, stejně jako ve studii Kulichové et al. (2022). Tato matice zakládá výpočet vzdálenosti na fixačním indexu ( $F_{ST}$ ), jenž je založen na párových rozdílech.  $F_{ST}$  index měří rozptyl alelových frekvencí v subpopulacích a udává zároveň jejich genetickou strukturu (Weir & Cockerham, 1984).

#### 9.5.6 Testy selekční neutrality

V programu Arlequin (Excoffier & Lischer, 2010) byla zároveň testována i selekční neutralita pomocí statistik Tajimovo D ( $D$ ) (Tajima, 1989) a Fuovo  $F_s$  ( $F_s$ ) (Fu, 1997) a Ewens-Wattersonova testu homozygotity ( $F$ ) (Watterson, 1978). Pro poslední jmenovanou statistiku byly použity pouze nesynonymní mutace.

V programu DnaSP (Rozas et al., 2017) byl proveden další z testů selekční neutrality – Fayovo a Wuovo  $H$  ( $H$ ) (Fay & Wu, 2000). Pro tuto analýzu bylo nutné přidat do souboru jako *outgroup* sekvenci genu *TAS2R38*. Použita byla opět sekvence JQ272199.1 od *Pan troglodytes* z databáze GenBank® (Clark et al., 2016).

Pátým testem selekční neutrality byl Maximum Frequency of Derived Mutations (MFDM) (Li, 2011) prováděný v příkazovém řádku, který byl použit například i ve studii Risso et al. (2016) nebo Kulichová et al. (2022). Pro tuto analýzu byla jako *outgroup* použita opět výše uvedená sekvence genu *TAS2R38* *Pan troglodytes*. Spolu s ní byly ale do souboru dat přidány jako tzv. detektory migrantů (*migrant detectors*) i další lidské sekvence genu *TAS2R38* od mimoafrických populací. Konkrétně bylo použito deset sekvencí (příloha č. 7) z databáze Ensembl release 105 (Howe et al., 2021). Analýza byla prováděna čtyřikrát, pokaždé s jinou pěticí detektorů.

Tajimovo D testuje distribuci frekvence alel v populaci. Tato statistika je založena na rozdílu mezi průměrným počtem nukleotidových rozdílů mezi sekvencemi a počtem segregovaných pozic ve vzorku (Tajima, 1989). Na podobném principu pracuje i Fuův  $F_s$  test,

který ale využívá vztahu mezi průměrným počtem nukleotidových rozdílů mezi sekvencemi a počtem alel (Fu, 1997). Ewens-Wattersonův test homozygotity je založen na předpokladu, že na základě působení rovnováhy mezi mutací a driftem dochází ke zvýšení počtu alel s nízkou frekvencí a ke snížení počtu alel s vysokou frekvencí. Tento test porovnává součet čtverců frekvencí alel určitého lokusu (pozorovanou homozygotitu) s počtem alel a velikostí souboru jedinců (očekávanou homozygotitu) (Watterson, 1978, 1986). Všechny tyto tři testy zároveň uvažují nerekombinantní DNA sekvenci, která se vyvíjí podle modelu *infinite-sites* a předpokládají tedy, že každá nová mutace se vyskytne na místě, které předtím nebylo v dané populaci mutované, a zároveň produkuje novou alelu, která předtím v dané populaci neexistovala (Fu, 1996; Tajima, 1989; Watterson, 1978).

Pozitivní hodnoty Tajimova a Ewens-Wattersonova testu lze pozorovat při balancující selekci, negativní hodnoty naopak při selekci direkcionalní. Kladné  $D$  hodnoty značí přebytek variant se střední frekvencí, záporné hodnoty naopak přebytek variant s nízkou frekvencí. V rámci  $F$  statistiky odpovídají kladné hodnoty vyššímu zastoupení heterozygotů a vyšším hodnotám očekávané homozygotity, záporné hodnoty naopak vyššímu zastoupení homozygotů a vyšším hodnotám pozorované homozygotity. Zároveň jsou ale tyto testy citlivé k demografickým změnám, i pokud nepůsobí selekce. Kladné hodnoty tedy mohou indikovat kromě balancující selekce např. i působení efektu hrdla láhve, či snížení efektivní velikosti populace. Záporné hodnoty mohou kromě direkcionalní selekce naopak značit i populační expanzi či genetický draft (Tajima, 1989; Watterson, 1986; Weedall & Conway, 2010). U Fuova  $F_s$  testu nulovou hypotézu zamítáme pouze za negativních hodnot, které značí přebytek vzácných variant. Záporné hodnoty v tomto případě opět indikují direkcionalní selekci či populační expanzi (Fu, 1997).

Fayův and Wuův  $H$  test se používá k měření přebytku variant s vysokou frekvencí oproti variantám se střední frekvencí. Pozitivní hodnoty  $H$  značí přebytek variant se střední frekvencí, který můžeme vysvětlit pozitivní či balancující selekcí, změnou efektivní velikosti populace, dělením či mísením populací nebo selekcí na pozadí. Negativní hodnoty nám naopak podávají informaci o přebytku variant s vysokou frekvencí, kterým se projevuje pozitivní selekce, genetický draft či specifické demografické procesy (Fay & Wu, 2000; Li, 2011). Jako příklad můžeme uvést situaci, kdy se mezi námi studovanými populacemi

vyskytuje mnoho fixních rozdílů a zároveň je v celém souboru pouze malé množství migrantů. V takovém případě lze očekávat, že převážné množství variant bude zastoupeno buď ve vysokých nebo v nízkých frekvencích (Fay & Wu, 2000).

Poslední z uvedených testů selekční neutrality, MFDM, se používá k detekci nedávné pozitivní selekce. Na tento test, jako na jediný z mnou používaných, nemá vliv změna efektivní velikosti populace ani jiné demografické události, jako je například vyšší míra populační struktury či mísení populací. Tento test vypovídá o působení pozitivní či balancující selekce a zároveň dokáže detekovat i nedávný genetický draft (Li, 2011).

Hodnoty testů  $D$ ,  $H$  a  $F$  byly považovány za signifikantní na hladině 2,5 %, tedy pokud byla jejich  $p$  nižší než 0,025 nebo vyšší než 0,975, jelikož jde o bilaterální testy selekční neutrality (Fay & Wu, 2000; Tajima, 1989; Watterson, 1986). Fuův  $F_s$  test a MFDM analýza jsou naopak testy unilaterální a testují se na hladině významnosti 5 %, statisticky signifikantní hodnoty jsou tedy značeny  $p$ -hodnotou nižší než 0,05 (Li, 2011). Pro hodnotu  $F_s$  platí obecně také hladina 5 %, ale autor doporučuje přísnější konfidenční interval (96 %), který interpretujeme jako  $p$  nižší než 0,02 (Fu, 1997).

#### 9.5.7 Definice ancestrálních a odvozených alel

V dalším kroku byly v programu BioEdit Sequence Alignment Editor verze 7.2.5 (Hall, 1999) porovnány lidské sekvence se sekvencemi lidoopů. Cílem této analýzy bylo zjistit, zda jsou námi zkoumané alely ancestrální a staly se tedy v určitém okamžiku v minulosti výhodou, či zda se jedná o novější odvozené alely. Konkrétně byly použity sekvence z databáze GenBank® a sice: JQ272202.1 od orangutana sumaterského *Pongo abelii*, JQ272203.1 a AY566404.1 od orangutana bornejského *Pongo pygmaeus*, JQ272201.1 a AY566403.1 od gorily nížinné *Gorilla gorilla*, JQ272203.1 a AY566404.1 od šimpanze bonobo *Pan paniscus* a také NM\_001009139.1, JQ272199.1 a AY566402.1 od šimpanze učenlivého *Pan troglodytes* (Clark et al., 2016).

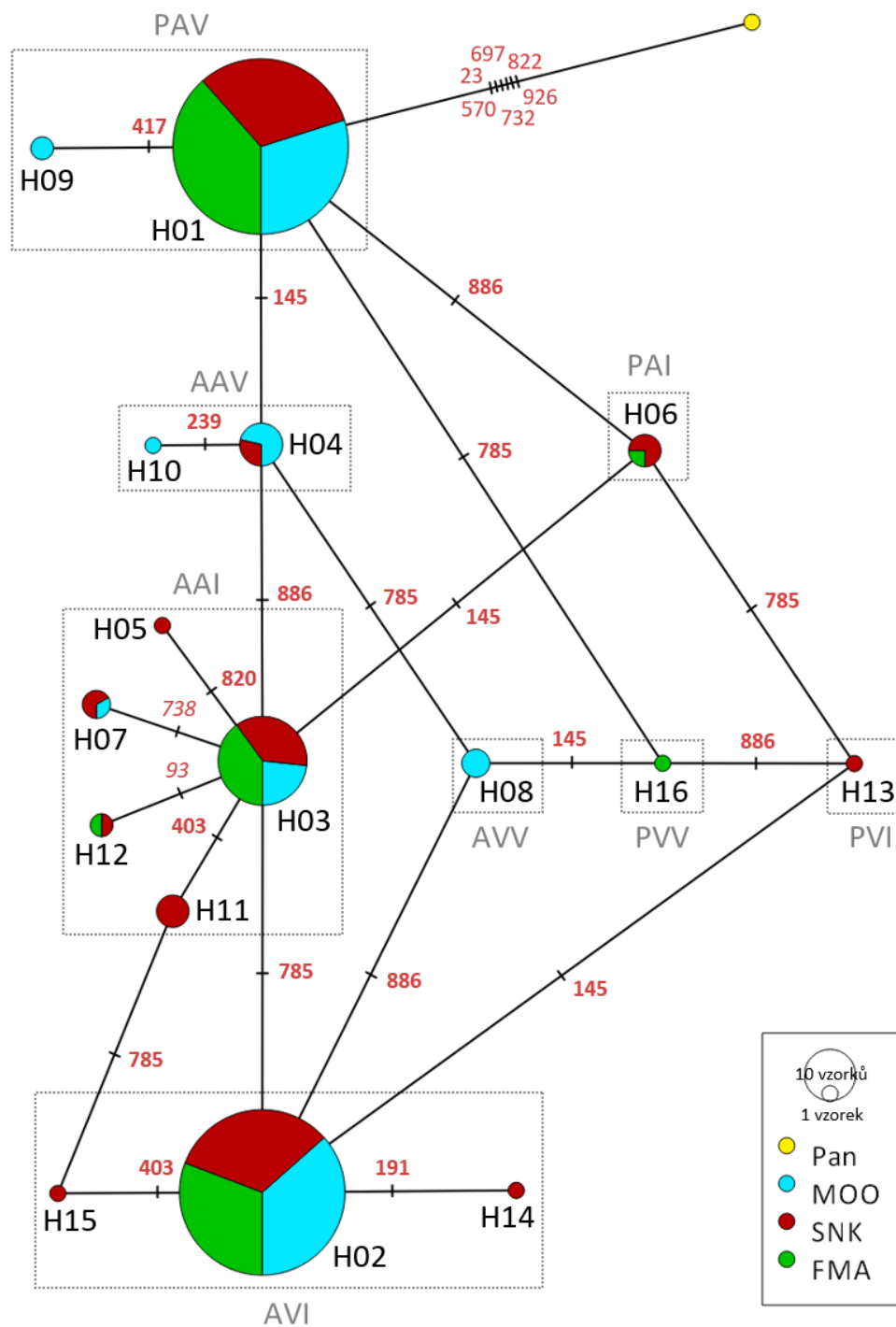
## 10 Výsledky

### 10.1 Varianty a haplotypy genu *TAS2R38*

V souboru bylo pozorováno celkem deset polymorfních pozic – dvě synonymní a osm nesynonymních mutací (tabulka č. 5) – podmiňujících 16 haplotypů (viz dále). U všech tří populací se společně vyskytovaly pouze mutace na AK pozicích 49, 262 a 296, respektive nukleotidových pozicích 145, 785 a 886, které podmiňují majoritní haplotypy PAV a AVI. U Fulbů se objevila navíc synonymní mutace na pozici 738, u Maurů tři nesynonymní mutace a u Soninků dvě synonymní a tři nesynonymní mutace. V rámci nesynonymních mutací byla identifikována jedna v databázi Ensembl (Howe et al., 2021) dosud nezaznamenaná mutace G417T, kterou se mi podařilo detekovat u jednoho homozygotního Maura. Na stejné nukleotidové pozici byla dříve u populace z Bangladéše pozorována ve frekvenci 0,01 mutace rs549418338 způsobující záměnu G za C (Fairley et al., 2020), která se ale u mnou zkoumaných populací nevyskytuje.

**Tabulka 5.** Frekvence alel genu *TAS2R38* u populací Mauritánie

<b>Synonymní</b>	<b>rs identifikátor</b>	<b>MOO</b>	<b>SNK</b>	<b>FMA</b>
C738T	rs140262989	-	0,010	0,011
G93A	rs148448145	-	0,010	-
<b>Nesynonymní</b>	<b>rs identifikátor</b>	<b>MOO</b>	<b>SNK</b>	<b>FMA</b>
C145G	rs713598	0,598	0,582	0,489
G191A	rs115966953	-	0,010	-
A239G	rs150209521	0,011	-	-
T403G	rs139843932	-	0,051	-
G417T	-	0,022	-	-
C785T	rs1726866	0,446	0,378	0,359
C820T	rs114288846	0,011	0,020	-
G886A	rs10246939	0,500	0,602	0,500



**Obr. 3.** Haplotypová síť znázorňující 16 haplotypů spolu s jejich poměrným zastoupením u zkoumaných populací Mauritánie a zařazením do skupin haplotypů podmíněných změnami na nukleotidových pozicích 145, 785 a 886 (haplotypy jsou v síti reprezentovány kruhy, jejichž velikost odpovídá frekvenci daného haplotypu ve zkoumaném souboru; tučné = nesynonymní mutace, kurzíva = synonymní mutace)



Deset zjištěných variabilních pozic podmiňuje celkem 16 haplotypů, jejichž sekvence jsou uvedeny v příloze č. 8. Haplotypová síť ilustrující fylogenetické vztahy těchto haplotypů a rovněž jejich zastoupení u mauritánských populací je znázorněna na obrázku č. 3. Konkrétní hodnoty zastoupení a frekvence těchto haplotypů u jednotlivých populací ukazuje příloha č. 9.

Můžeme si všimnout, že u všech populací jsou ve vysoké míře zastoupeny haplotypy H01, H02 (celkem u 117 a 104 jedinců respektive) a H03 (u 30 jedinců). Co se týče rozložení těchto haplotypů u jednotlivých populací, nenajdeme zde určité rozdíly. Haplotyp H01 můžeme u Maurů i Soninků pozorovat ve frekvencích kolem 0,38. U Fulbů je zastoupení vyšší, dosahuje frekvence 0,49. U haplotypu H02 vidíme naopak trochu vyšší frekvence u populace Maurů (0,41), zatímco u Soninků a Fulbů je tento haplotyp zastoupen ve frekvencích kolem 0,35. Opačně je tomu u H03, kde pozorujeme vyšší frekvence u Soninků a Fulbů (kolem 0,12) a nižší u Maurů (0,08).

Haplotypy H04 a H05 se vyskytují u sedmi a tří jedinců z populace Maurů a Soninků, H06 a H07 naopak u čtyř a dvou jedinců z populace Soninků a Fulbů. U populace Maurů se k tomu můžeme setkat ještě s haplotypy H08 (tři jedinci), H09 (dva jedinci) a H10 (jeden jedinec), u Soninků s H11 (čtyři jedinci) a H12 až H15, který se každý vyskytuje pouze u jednoho jedince a u Fulbů s haplotypem H16 (jeden jedinec). V populaci Maurů se vyskytuje celkem osm haplotypů, u Soninků 12 a u Fulbů pouze šest.

Co se týče fylogenetických vztahů mezi haplotypy, můžeme konstatovat, že lidé se od šimpanze učenlivého *Pan troglodytes* odlišují v genu *TAS2R38* na minimálně šesti pozicích; evolučně nejbližší je haplotyp H01 (PAV). Ten lze tedy považovat za ancestrální, jelikož právě od něj jsou odvozeny všechny zbývající lidské haplotypy. Odlišností člověka a šimpanze, stejně jako ancestrálním haplotypům věnuji kapitolu 10.5. Pro vznik haplotypu H02 (AVI) podmiňujícího nechutnačství muselo dojít vždy ke třem mutacím (145, 785 a 886) a tedy ke vzniku dalších haplotypů (H04 a H03, H16 a H08, H06 a H13).

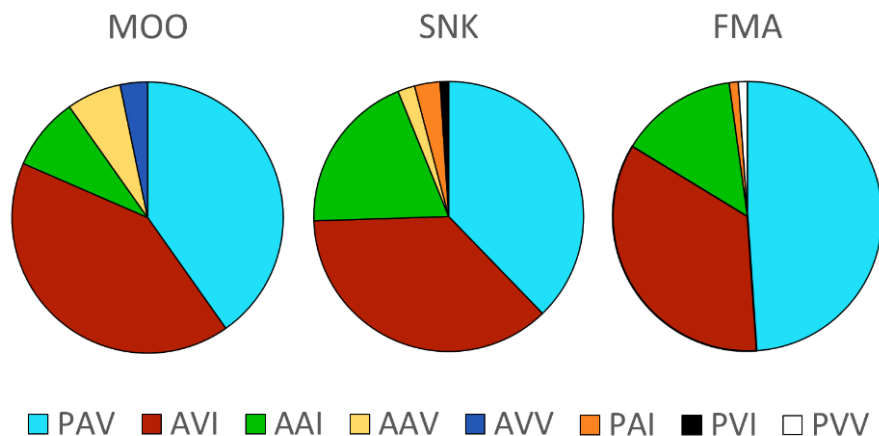
Pokud se v rámci těchto osmi haplotypů zaměříme pouze na tři hlavní polymorfní pozice v genu *TAS2R38* (145, 785 a 886), můžeme tyto haplotypy označit i názvy jako je například PAV, AVI, AAI atd. K těmto haplotypům jsou do skupin znázorněných v síti řazeny i tzv. subhaplotypy (H05, H07, H09 až H12, H14 a H15), které jsou podmíněné změnou na některé z dalších polymorfních pozic. Každá tato změna podmiňuje jeden či dva

z těchto subhaplotypů. Nejvíce početnou skupinou jsou haplotypy řadící se pod AAI. Zde k centrálnímu haplotypu (H03) náleží další čtyři subhaplotypy. Dva z nich (H07 a H12) se od H03 odlišují pouze synonymními mutacemi. Haplotypů podmíněných nesynonymními mutacemi bylo tedy pozorováno celkem 14. Další skupiny (PAV, AVI, AAV) jsou tvořené dvěma až třemi haplotypy a vyskytly se i takové, které jsou zastoupené pouze jedním haplotypem a žádný další subhaplotyp se v nich nevyskytuje (PAI, AVV, PVV, PVI).

Jak už bylo zmíněno výše, mutace na pozicích 145, 785 a 886 podmiňují celkem osm haplotypů. Mezi ně patří jak majoritní haplotypy PAV a AVI, které jsou zodpovědné za citlivost k PTC, tak i mnoho dalších minoritních haplotypů. Poměrné zastoupení všech těchto haplotypů u populací Mauritanie je znázorněno na obrázku č. 4.

Vidíme, že u všech populací se vyskytují ve vysoké míře haplotypy PAV, AVI a AAI, obdobně jako haplotypy H01, H02 a H03 zmíněné výše, jelikož právě ty odpovídají těmto haplotypům a nenajdeme v nich mutaci na žádné jiné pozici. Haplotyp PAV najdeme celkem u 119 jedinců napříč populacemi, AVI u 106 a AAI u 40 jedinců. Rozložení těchto haplotypů je mezi populacemi opět rovnoměrné. PAV pozorujeme u Maurů, Soninků a Fulbů ve frekvencích 0,40, 0,38 a 0,49. Haplotyp AVI se vyskytuje ve frekvencích 0,35 (u Fulbů) až 0,41 (u Maurů). Haplotyp AAI má největší rozmezí. U Maurů pozorujeme frekvenci pouhých 0,09, u Fulbů 0,14 a u Soninků dokonce 0,19. Haplotypy AAV a PAI jsou každý zastoupeny u dvou populací celkem u osmi a čtyř jedinců. Zbylé haplotypy se vyskytují pouze v ojedinělých případech u jedné z hodnocených populací. Haplotyp AAV najdeme konkrétně u třech heterozygotních jedinců z populace Maurů, PVI u jednoho ze Soninků a PVV u jednoho jedince z populace Fulbů.

V rámci celého souboru je tedy přes 42 % haplotypů tvořeno haplotypem PAV, následovaného haplotypem AVI s téměř 38 % (viz tabulka č. 6). Zároveň se u zkoumaných mauritánských populací vyskytuje ve vyšší míře také haplotyp AAI (cca 14 %) a zanedbatelný není ani příspěvek haplotypu AAV s téměř 3 %. Podobný podíl na všech haplotypech mají společně i zbylé čtyři haplotypy. Závěrem tedy můžeme shrnout, že se ve zkoumaném souboru vyskytly všechny možné kombinace haplotypů podmíněných mutacemi na těchto třech pozicích.



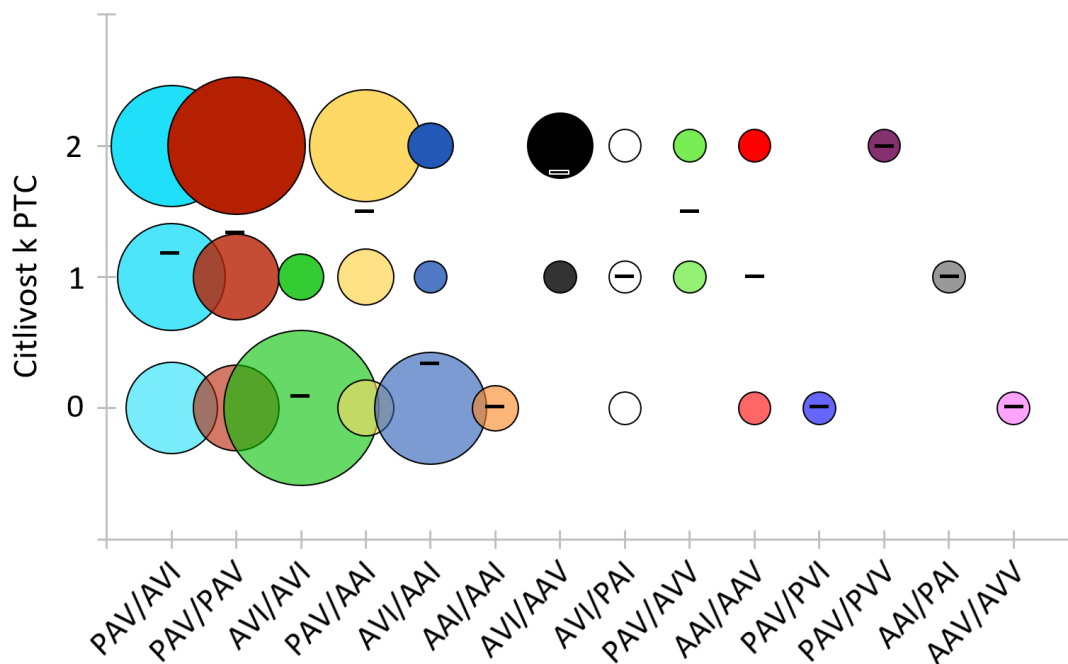
**Obr. 4.** Graf znázorňující poměrné zastoupení haplotypů na AK pozicích 49, 262 a 296 u populací Mauritánie

**Tabulka 6.** Průměrná frekvence haplotypů na AK pozicích 49, 262 a 296 u populací Mauritánie

PAV	AVI	AAI	AAV	PVI	PAI	AVV	PVV
42,20 %	37,59 %	14,18 %	2,84 %	0,35 %	1,42 %	1,06 %	0,35 %

## 10.2 Korelace genotyp/fenotyp

Citlivost k PTC byla měřena na škále od 0 (žádná citlivost k PTC) do 2 (vysoká citlivost k PTC). Asociaci citlivosti k PTC s konkrétními genotypy můžeme spolu s její frekvencí ve zkoumaném souboru vidět na obrázku č. 5. Pozorováno bylo celkem 14 různých genotypů. Nejčastějšími genotypy, které se vyskytly každý u více než 20 jedinců, jsou PAV/AVI, PAV/PAV a AVI/AVI. Z těchto tří genotypů dosáhl nejvyšší průměrné hodnoty citlivosti k PTC genotyp PAV/PAV (1,34). Nejnižší průměrnou hodnotu naopak připisujeme genotypu AVI/AVI (0,08). Genotyp PAV/AVI má průměrnou hodnotu citlivosti k PTC 1,18.



**Obr. 5.** Graf znázorňující citlivost jednotlivých genotypů k PTC a jejich frekvenci ve zkoumaném souboru (velikost kruhů odpovídá frekvenci daného genotypu ve zkoumaném souboru; černé úsečky znázorňují průměrné hodnoty citlivosti jednotlivých genotypů k PTC, na ose Y 2 = vysoká citlivost, 1 = střední citlivost, 0 = žádná citlivost (nechutnačství))

Dalšími poměrně často zastoupenými genotypy jsou PAV/AAI a AVI/AAI, které se vyskytly u 18 a 15 jedinců. První z těchto genotypů má průměrnou citlivost 1,5, druhý pouze 0,33. Homozygotní genotyp AAI/AAI, zjištěný pouze u dvou jedinců, zodpovídá za nulovou citlivost k PTC. U pěti jedinců byl zaznamenán genotyp AVI/AAV, k němuž náleží průměrná citlivost o hodnotě 1,8. Genotyp AVI/PAI byl nalezen u tří jedinců, u nichž byla u každého zaznamenána jiná citlivost k PTC. Průměrná hodnota citlivosti pro tento genotyp je tedy 1. Zbylé genotypy byly ve zkoumaném souboru zastoupené pouze u jednoho či dvou jedinců, u kterých navíc nebyly zjištěny ani shodné hladiny citlivosti k PTC. Nejvyšší průměrnou hodnotu citlivosti z nich vykázal genotyp PAV/PVV (2), následován genotypem PAV/AVV s průměrem 1,5. Následují genotypy AAI/AAV a AAI/PAI s průměrnou citlivostí 1 a genotypy PAV/PVI a AAV/AVV, které odpovídaly nulové citlivosti k PTC.

Korelace genotypu a fenotypu byla testována pomocí Kruskal-Wallisova testu. V tomto testu byly ke každému ze 14 genotypů přiřazeny mediány citlivosti k PTC. U většiny

z těchto genotypů se mediány shodovaly s průměrnými hodnotami citlivosti naznačenými na obrázku č. 5. Vyskytlo se ale i několik genotypů s rozdílnými hodnotami. Genotypům PAV/PAV, PAV/AAI a AVI/AAV odpovídá medián 2, genotypům AVI/AVI a AVI/AAI naopak medián 0. Heterozygoti PAV/AVI mají medián 1. Současně byla u tohoto testu pozorována vysoce signifikantní asociace ( $p < 0,001$ ) mezi citlivostí k PTC (testovanou proměnnou) a genotypem, který byl použit k vytvoření skupin, a to i v případě dat upravených k věku a pohlaví. Je tedy zřejmé, že věk ani pohlaví v mém souboru nijak neovlivňují citlivost k PTC. Můžeme tak přijmout alternativní hypotézu, která říká, že u třech zkoumaných afrických populací jsou genotypy genu *TAS2R38* silným prediktorem chutnačství PTC.

### 10.3 Intrapopulační a interpopulační analýzy

Výsledky intrapopulační analýzy jsou uvedeny v tabulce č. 7. V rámci genové diverzity najdeme nejnižší hodnoty u populace Fulbů (0,6292), nejvyšší naopak u Soninků (0,7280). Stejnou tendenci můžeme pozorovat i u nukleotidové diverzity a průměrného počtu párových rozdílů. Nukleotidová diverzita dosahuje u všech populací velice podobných hodnot, nejvyšší opět u Soninků (0,001647) a nejnižší u Fulbů (0,001495). Výsledky  $D_{ii}$  poukazují na to, že nejvíce diverzifikovaní jsou Soninkové, jak naznačuje i vyšší počet haplotypů v této populaci. Naopak nižší diverzitu můžeme konstatovat u populace Fulbů, u nichž jsem detekovala pouze šest haplotypů. V souladu s tímto zjištěním jsou i počty polymorfních míst u jednotlivých populací zmíněné výše.

**Tabulka 7.** Diverzita genu *TAS2R38*

Populace	n	k	h ± sd	$\pi$ ± sd	$D_{ii}$
MOO	92	8	0,6816 ± 0,0302	0,001574 ± 0,001048	1,5776 ± 0,9480
SNK	98	12	0,7280 ± 0,0285	0,001647 ± 0,001084	1,6501 ± 0,9804
FMA	92	6	0,6292 ± 0,0294	0,001495 ± 0,001008	1,4976 ± 0,9116

(n = počet jedinců v populaci, k = počet haplotypů, h = genová diverzita,  $\pi$  = nukleotidová diverzita,  $D_{ii}$  = průměrný počet párových rozdílů)

V rámci interpopulační analýzy byla v genu *TAS2R38* u mauritánských populací zjištěna genetická diferenciace pomocí  $F_{ST}$  analýzy. Výsledná Reynoldsova matice s hodnotami  $F_{ST}$  je zobrazena v tabulce č. 8. Hodnoty se pohybují v rozmezí 0 až 1, kde 0 značí nediferencovanost vzorů a 1 naopak naprostou diferencovanost. Mezi žádnými populacemi nedosáhly hodnoty statistické signifikance, jelikož žádná z p-hodnot nebyla nižší než hladina významnosti 5 %. Mauritánské populace se tedy mezi sebou v genu *TAS2R38* neliší.

**Tabulka 8.** Hodnoty  $F_{ST}$  a jejich statistická významnost

	<b>FMA</b>	<b>MOO</b>	<b>SNK</b>
<b>FMA</b>	0	0,27938 ± 0,0047	0,23037 ± 0,0047
<b>MOO</b>	0,00224	0	0,29185 ± 0,0048
<b>SNK</b>	0,00379	0,00119	0

(hodnoty  $F_{ST}$  jsou zobrazeny pod diagonálou, p-hodnoty statistické významnosti naopak nad diagonálou)

#### 10.4 Testy selekční neutrality

Výsledky testů selekční neutrality jsou znázorněny v tabulce č. 9. Hodnoty Tajimovy D statistiky byly u všech populací kladné, což značí přebytek variant se střední frekvencí a indikuje tedy působení balancující selekce, efektu hrdla láhve, či snížení efektivní velikosti populace. Nejvyšší hodnotu můžeme pozorovat u populace Fulbů (1,825), ale ani zde nebylo dosaženo statistické významnosti. Citlivější Fuova  $F_s$  statistika ukázala kladnou hodnotu u Fulbů a záporné hodnoty u Maurů a Soninků, které naznačují direkcionální selekci či populační expanzi. Nejnižší hodnotu  $F_s$  můžeme vidět u Soninků (-3,212). Ani zde nebyla žádná z hodnot statisticky signifikantní. Stejně tomu bylo i u Fayovy and Wuovy statistiky, v rámci které dosáhly hodnoty u populace Maurů a Soninků opět záporných hodnot indikujících pozitivní selekci či genetický draft a u Fulbů naopak kladných (0,248), které podávají informaci o přebytku variant se střední frekvencí. Nejnižší hodnotu můžeme znovu

vidět u Soninků (-0,061). Ani MFDM test neposkytl statisticky signifikantní výsledky. U Maurů a Soninků nabývalo  $p$  hodnot kolem 0,8, u populace Fulbů dosáhlo hodnoty 1,000. Ewens-Wattersonova F statistika ukázala u populace Soninků záporné hodnoty (-0,016) a tedy vyšší zastoupení homozygotů, a naopak kladné hodnoty a více heterozygotů v populacích Maurů a Fulbů. Žádná z těchto hodnot opět statistické významnosti nedosáhla.

**Tabulka 9.** Testy selekční neutrality genu *TAS2R38*

Populace	D	p (D)	Fs	p (Fs)	H	p (H)	p (MFDM)	$\Delta F$	p (F)
MOO	0,773	0,780	-0,458	0,489	-0,054	0,289	0,813	0,007	0,570
SNK	0,155	0,626	-3,212	0,094	-0,061	0,299	0,804	-0,016	0,670
FMA	1,825	0,960	0,866	0,689	0,248	0,398	1,000	0,101	0,329

(D = Tajimova D statistika, p (D) = statistická významnost Tajimovy D statistiky, Fs = Fuova Fs statistika, p (Fs) = statistická významnost Fuovy Fs statistiky, H = Fayova a Wuova H statistika, p (H) = statistická významnost Fayovy a Wuovy H statistiky, p (MFDM) = statistická významnost Liova testu Maximum Frequency of Derived Mutations,  $\Delta F$  = rozdíl mezi očekávanou a pozorovanou hodnotou Ewens-Wattersonova F statistiky nesynonymních mutací, p (EW) = statistická významnost Ewens-Wattersonovy  $\Delta F$  statistiky)

## 10.5 Definice ancestrálních a odvozených alel

Ve zkoumaných sekvencích lidí a lidoopů můžeme pozorovat rozdíly na mnoha pozicích. Nejvíce se jich vyskytlo mezi sekvencemi orangutanů a všemi ostatními zkoumanými sekvencemi. Celkem se gorily, šimpanzi a lidé liší v genu *TAS2R38* od orangutanů na jedenácti nukleotidových pozicích (konkrétně 22, 25, 106, 129, 300, 517, 519, 798, 823, 865 a 908). Na pozici 865 se nukleotid C vyskytoval pouze u orangutana sumaterského *Pongo abelii*. Několik odlišností bylo možné pozorovat také u goril a šimpanzů. Gorily se od všech ostatních liší na dvou pozicích (692 a 995), zatímco šimpanzi na pěti (23, 78, 287, 732 a 822). Dvě z těchto pěti pozic (78 a 287) jsou unikátní pouze pro šimpanze bonobo *Pan paniscus*.

Podle mutace na nukleotidové pozici 885 můžeme odlišit orangutana a *Pan paniscus* (nukleotid T) od gorily a člověka (nukleotid C) a dle pozice 927 rozlišíme orangutana a gorilu

(nukleotid A) od šimpanze a člověka (nukleotid G). Všechny tři druhy lidoopů můžeme odlišit od člověka na základě tří pozic (570, 697 a 926). Můžeme tedy shrnout, že člověk nosící ve svém genomu variantu genu *TAS2R38*, která je evolučně nejbližší té šimpanzi, se liší od šimpanze učenlivého *Pan troglodytes*, který je používán jako *outgroup* v mnoha analýzách, celkem na šesti pozicích (23, 570, 697, 732, 822 a 926), jak už bylo naznačeno v kapitole 10.1.1. Lidé, kteří mají v tomto genu mutace na některé z dalších pozic, se od šimpanze liší na více než šesti pozicích.

Nejpodstatnější částí této analýzy bylo porovnání genu *TAS2R38* člověka a lidoopů na třech hlavních nukleotidových pozicích podmiňujících haplotypy PAV a AVI s cílem definovat ancestrální a odvozené alely. Na pozici 145 se u všech lidoopů vyskytuje nukleotid C a je tedy ancestrální alelou. Spolu s ním najdeme u lidské populace i nukleotid G, který je alelou odvozenou. Na pozici 785 je opět ancestrální alela C a spolu s ní najdeme v tomto případě u lidí odvozenou alelu T. Na poslední pozici 886 je ancestrální alelou G, která se vyskytuje u všech lidoopů. V lidské populaci k ní náleží odvozená alela A.

Pokud se na tato tři polymorfní místa v genu *TAS2R38* podíváme jako na celý haplotyp, můžeme říci, že ancestrálním haplotypem je PAV, který je podmíněn právě pořadím nukleotidů CCG, což odpovídá i haplotypové síti popsané v kapitole 10.1.1. Tento haplotyp je tedy evolučně nejbližší šimpanzimu genu *TAS2R38* a jeho nositelé se od šimpanze liší pouze na šesti pozicích, jak už bylo zmíněno výše.



## 11 Diskuze

Tato práce se zaměřuje na polymorfní místa v genu *TAS2R38*, která podmiňují senzitivitu k PTC u tří populací Mauritánie (Fulbů, Maurů a Soninků), z nichž první dvě můžeme označit za původně pastevecké a poslední za zemědělskou, tedy za populace odlišného subsistenčního základu. Cílem bylo stanovit, které alely genu *TAS2R38* se v západní Africe pojí s chutnačstvím a které s nechutnačstvím PTC a zjistit, zda u některých populací ty či ony převažují. Gen byl rovněž testován na působení selekce.

### 11.1 Varianty a haplotypy genu *TAS2R38*

V rámci mnou zkoumaného souboru bylo v genu *TAS2R38* pozorováno celkem deset variant typu SNPs, z nichž dvě lze označit za synonymní a osm za nesynonymní. Do dnešní doby bylo nejvíce polymorfních míst pozorováno ve studii Campbella et al. (2012), kteří zkoumali 611 jedinců 59 afrických populací z Kamerunu, Keni a Tanzánie praktikující různé druhy subsistence (lovci a sběrači, pastevci a zemědělci) a zároveň i srovnávací soubor 132 jedinců mimoafrických populací z Izraele, Pákistánu, Itálie, Španělska, Číny, Japonska a Mexika. Je třeba poznamenat, že každá z populací byla v souboru zastoupena pouze malým množstvím jedinců (průměr  $n=11$ ). V souboru, který jsem měla k dispozici já, je naopak každá jednotlivá populace zastoupena mnohem vyšším počtem jedinců (v průměru 49). Podobného počtu případů dosahuje ve výše uvedeném výzkumu z roku 2012 pouze čínská populace ( $n=62$ ) a populace Fulbů z Kamerunu ( $n=48$ ).

Autoři výše citované studie zjistili u afrických populací v genu *TAS2R38* celkem 21 SNPs (Campbell et al., 2012). Osm z nich se shoduje s mutacemi pozorovanými v rámci mého souboru mauritánských populací, ve kterém byly ale navíc pozorovány i polymorfismy na pozicích 417 a 738. Na pozici 417 byla u jednoho homozygotního jedince zaznamenána dosud neznámá nesynonymní mutace G417T. Mohlo by se tedy jednat o vzácnou mutaci, ale je překvapující, že jsem ji detekovala v homozygotním stavu. Naopak ve studii z roku 2012 byly v tomto genu rozpoznány ještě SNPs na pozicích 17, 106, 362, 368, 416, 569, 649, 704, 802, 809, 822, 823 a 932 (Campbell et al., 2012), což je bezesporu způsobeno větším počtem případů a především mnohem širším geografickým zastoupením zkoumaných populací.

Všech deset polymorfních pozic podmiňuje v mém souboru celkem 16 haplotypů na rozdíl od výše zmíněné práce, ve které bylo pozorováno celkem 21 haplotypů podmíněných 21 SNPs (Campbell et al., 2012). V této studii byl k rekonstrukci haplotypů použit program PHASE verze 2.1. (Stephens & Scheet, 2005; Stephens et al., 2001) a k vytvoření haplotypové sítě program Network verze 4.5 a metoda *median joining* (Bandelt et al., 1999). To odpovídá i mé práci, ve které byly oba tyto programy použity ke kontrole haplotypů a haplotypové sítě z programů Arlequin verze 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010) a PopART verze 1.7 (Leigh & Bryant, 2015) a data z nich se shodovala s výsledky z těchto programů.

Současně byly ve zkoumaném souboru studie z roku 2012 (pokud se zaměříme pouze na tři hlavní polymorfní místa 145, 785 a 886 v tomto genu), zastoupeny pouze haplotypy PAV, AVI, AAI a AAV a zároveň subhaplotypy podmíněné změnou na jakékoli jiné pozici, které spadají do skupin pod tyto haplotypy (Campbell et al., 2012). Celkem tedy tito autoři pozorovali pět subhaplotypů PAV, šest subhaplotypů AVI a šest subhaplotypů AAI, mezi které řadí i v literatuře zmiňované subhaplotypy ARARI a AHACI (Desai et al., 2011) podmíněné změnami na pozicích 239 a 820. V rámci mého souboru byly zjištěny nejen haplotypy PAV, AVI, AAI a AAV, ale také zbývající kombinace AVV, PVV, PVI a PAI vyskytující se ve velmi malém počtu případů. K tomu byly pozorovány i dva subhaplotypy AVI, jeden subhaplotyp PAV, jeden subhaplotyp AAV a čtyři subhaplotypy AAI, v rámci nichž byl identifikován pouze subhaplotyp AHACI, nikoli však ARARI.

PAV, AVI, AAI, AAV a PVI patří v literatuře mezi nejčastěji zaznamenané haplotypy (Bufo et al., 2005; Carrai et al., 2011; Kim et al., 2003; Risso et al., 2016). Zbylé tři byly pozorovány pouze v několika málo studiích, z nichž pouze jedna (Risso et al., 2016) identifikovala všech osm haplotypů stejně jako moje diplomová práce. V této studii bylo zkoumáno velké množství populací z Afriky, Asie, Evropy a jižní Ameriky a také několik populací z Oceánie a severní Ameriky. Žádná z populací Mauritanie, kterým se věnuji ve své práci, v daném souboru zastoupena nebyla.

Výsledky mých analýz rovněž ukázaly, že ancestrálním haplotypem je u člověka PAV a všechny zbývající haplotypy jsou odvozeny právě od něj. Tento haplotyp je evolučně nejbližší šimpanzimu genu *TAS2R38* a zároveň se vyskytuje i u všech lidoopů, což je v souladu se zjištěním studie z roku 2006, ve které autoři uvádějí, že alely nechutnačství

jsou jak u lidí, tak u šimpanzů nezávisle evolučně odvozené z ancestrálních alel chutnačství (Wooding et al., 2006).

U všech tří zkoumaných populací Mauritanie se vyskytly pouze majoritní mutace na pozicích 145, 785 a 886. Současně ale nebyl u všech tří populací pozorován výskyt všech osmi haplotypů podmíněných mutacemi na těchto pozicích. U Maurů, Soninků a Fulbů se společně objevily pouze haplotypy PAV, AVI a AAI, a to v zastoupení přibližně 42 %, 38 % a 14 %, což je v souladu s jiným výzkumem, ve kterém byl pozorován výskyt těchto tří haplotypů v Africe v podobném zastoupení (Risso et al., 2016). V mé práci byly na rozdíl od tohoto výzkumu pozorovány u afrických populací i haplotypy PAI a PVV. Přítomnost těchto dalších minoritních haplotypů a zejména zvýšené zastoupení haplotypu AAI podporuje fakt, že v Africe pozorujeme větší genovou a nukleotidovou diverzitu na rozdíl od zbytku světa, kde jsou ve vysoké míře zastoupeny zejména haplotypy PAV a AVI (Risso et al., 2016).

V rámci mého souboru byla nejvíce diverzifikovaná populace Soninků, u které jsem zaznamenala výskyt osmi polymorfních míst, 12 haplotypů a zároveň i nejvyšší hodnoty genové a nukleotidové diverzity včetně průměrného počtu párových rozdílů. Nejnižší hodnoty těchto ukazatelů genetické diverzity se naopak vyskytly u Fulbů, kteří jsou se čtyřmi polymorfními místy a šesti haplotypy nejméně diverzifikovaní.

Pokud porovnáme tyto výsledky s předchozími studiemi, můžeme konstatovat, že se hodnoty nukleotidové diverzity u Maurů shodují s hodnotami u populací Kamerunu (0,00157), u Soninků s populacemi Keni (0,00163) a u Fulbů s populacemi Tanzánie (0,00147). Zároveň bylo u těchto populací pozorováno 15, 14 a čtyři polymorfní pozice, respektive (Campbell et al., 2012), což je také v souladu s výsledky mé práce. Naopak hodnoty genové diverzity se od jiných afrických populací mírně liší. U populací z Keni, Nigérie a Sierry Leone byly pozorovány hodnoty v rozmezí  $0,78 \pm 0,02$  až  $0,81 \pm 0,01$  (Risso et al., 2016). Mauritánské populace zkoumané v mé práci naopak dosáhly hodnoty v rozmezí  $0,63 \pm 0,03$  až  $0,73 \pm 0,03$ , což je způsobeno pravděpodobně větším počtem případů zastoupených ve studii z roku 2016. Tato studie se zaměřovala na 193 jedinců z Keni, 170 ze Sierry Leone a na dvě populace z Nigérie čítající celkem 418 jedinců (Risso et al., 2016).

## 11.2 Fenotypové projevy genotypů a haplotypů

Ve mnou zkoumaném souboru mauritánských populací bylo pozorováno celkem 14 různých genotypů. Průměrné hodnoty a mediány citlivosti k PTC ukázaly, že v rámci tří nejčastěji zastoupených genotypů se chutnačství vyskytuje u lidí s genotypem PAV/PAV, nechutnačství u jedinců se sestavou AVI/AVI a střední citlivost k PTC u heterozygotního genotypu PAV/AVI.

Pokud se zaměříme na haplotypy, je haplotypem chutnačství PAV a naopak s nechutnačstvím je spojen AVI, což je de facto v souladu i s dříve publikovanými studiemi (Bufe et al., 2005; Campbell et al., 2012; Kim et al., 2003). Ukazuje to mimo jiné i na to, že v rámci často zastoupených genotypů je uvedená metoda zjištění fenotypu chutnačství PTC pomocí testovacích papírků od firmy Findel docela dobrým ukazatelem.

V předchozích studiích zabývajících se tímto tématem byla ke zjištění fenotypu použita modifikovaná Harris-Kalmusova metoda rozpoznání prahové hodnoty (Harris & Kalmus, 1951). Použito bylo celkem 14 různých roztoků PTC (nejnižší koncentrace 1  $\mu\text{mol}$ , která se u každého dalšího dvakrát zvyšovala). Každý jedinec ochutnával roztoky počínaje tím nejslabším do té doby, než byl schopný PTC detekovat. Následně bylo jedinci předloženo šest šálků (tři s vodou a tři s PTC o dané koncentraci) a zadán úkol rozřadit je do dvou skupin na základě chuti. Pokud vzorky těchto roztoků osoba rozřadit nedokázala, roztok byl vyměněn za ten s vyšší koncentrací a pokus opakován. Za nechutnače byli následně považováni jedinci neschopní cítit PTC před roztokem s koncentrací nižší než 267  $\mu\text{mol}$  (Bufe et al., 2005; Kim et al., 2003). Jiná studie postupovala obdobným způsobem, jen s tím rozdílem, že bylo použito celkem sedm nařazených roztoků PTC na škále od 13 do 1 (Campbell et al., 2012).

Z dalších v mém souboru poměrně často zastoupených genotypů jsou se silným chutnačstvím k PTC asociovány pravděpodobně i genotypy PAV/AAI a AVI/AAV, naopak s nechutnačstvím genotypy AVI/AAI a AAI/AAI. Studie z roku 2012 testující celkem 463 jedinců z Keni a Kamerunu naopak přiřazuje všem čtyřem genotypům střední citlivost k PTC (Campbell et al., 2012), obdobně jako jiná studie k homozygotnímu genotypu AAI/AAI (Bufe et al., 2005). Tyto výsledky ukazují, že v Africe je díky vyššímu zastoupení genotypů a haplotypů se střední citlivostí k PTC distribuce fenotypů hořké chuti unimodální (Campbell et al., 2012), s čímž jsou v rozporu výsledky mé práce, které žádný z těchto genotypů

se střední citlivostí nespojují. Rozdílné výsledky mohou být způsobeny jinou metodou zjišťování fenotypu, či menším souborem zkoumaných jedinců v mé práci. Různorodé výsledky byly rovněž obdrženy pro genotyp AVI/AAV, kterému je v některých studiích přiřazována také nulová (Carrai et al., 2011), či velmi nízká citlivost k PTC (Kim et al., 2003).

Častější výskyt genotypů obsahujících haplotyp AAI je v souladu s větší genovou a nukleotidovou diverzitou u afrických populací (Risso et al., 2016), jak již bylo zmíněno výše. Risso et al. (2016) zároveň uvádějí, že nejčastějším genotypem obsahujícím haplotyp AAI je v Africe PAV/AAI, následovaný genotypem AVI/AAI a homozygotní sestavou AAI/AAI, která se vyskytuje pouze v subtropických oblastech. Tato posloupnost je posloupnost patrná i v mé studii, jelikož genotyp PAV/AAI byl pozorován u 18 jedinců, AVI/AAI u 15 a AAI/AAI pouze u dvou jedinců.

Z genotypů zastoupených v mém souboru pouze u několika málo jedinců by silnému chutnačství mohly odpovídat i genotypy PAV/PVV a PAV/AVV, střední citlivosti poté genotypy AVI/PAI, AAI/AAV a AAI/PAI a nechutnačství PAV/PVI a AAV/AVV. Z těchto genotypů byly ale v dřívějších studiích pozorovány pouze dva – PAV/PVV, kterému je připisováno chutnačství (Carrai et al., 2011) a PAV/AVV, ke kterému zatím nebyl přiřazen žádný konkrétní fenotyp (Pemberton et al., 2008).

Carraiová et al. (2011) považovali ve své studii chutnačství za fenotypový projev všech genotypů, které mají u jednoho haplotypu na pozici 49 prolin a u druhého alanin bez ohledu na AK na dalších dvou pozicích (P--/A--). To by tedy v rámci mnou zkoumaného souboru odpovídalo genotypu PAV/AVV a výše zmíněnému PAV/AAI, ale naopak nesouhlasilo s genotypy AVI/PAI a AAI/PAI a výše zmíněným PAV/AVI, které se pojí se střední citlivostí. Jelikož je ale genotyp PAV/AVI považován za genotyp se střední citlivostí k PTC v mnoha studiích (Bufe et al., 2005; Campbell et al., 2012; Kim et al., 2003), je možné, že Carraiová et al. (2011) zahrnuli do skupiny chutnačství všechny genotypy, které podmiňovaly citlivost k PTC alespoň v malé míře, a nemusely se nutně pojit se silným chutnačstvím.

V genu *TAS2R38* byly pozorovány i další genotypy, jako je například PAV/AAV, AAV/AAV a PVI/PVI, které jsou spojovány se střední citlivostí k PTC (Bufe et al., 2005;

Campbell et al., 2012; Kim et al., 2003), či AVI/PVV, který je řazen do skupiny chutnačství (Carrai et al., 2011). Žádný z těchto genotypů se ale v mnou zkoumaném souboru neobjevil.

Korelace genotypu a fenotypu provedená v této diplomové práci na dosud nezkoumaných populacích západní Afriky tedy potvrdila, že majoritním genotypem chutnačství je PAV/PAV, zatímco AVI/AVI se pojí s nechutnačstvím a PAV/AVI se střední citlivostí k PTC, respektive, že majoritním haplotypem chutnačství je PAV a majoritním haplotypem nechutnačství AVI.

Fenotypové projevy zbývajících genotypů je k získání jednoznačných výsledků nutné ověřit v rámci většího souboru jedinců, jelikož řada z nich se neshoduje s výsledky publikovanými v jiných studiích a většina těchto genotypů byla pozorována pouze u malého počtu jedinců. Zároveň by ke zpřesnění asociace genotypu a fenotypu u těchto jedinců pomohl i jiný způsob determinace citlivosti k PTC, například použití modifikované Harris-Kalmusovy metody rozpoznání prahové hodnoty (Harris & Kalmus, 1951) a škály roztoků PTC o různých koncentracích, jako tomu bylo ve studiích uvedených výše (Bufe et al., 2005; Campbell et al., 2012; Kim et al., 2003).

Tato metoda by pomohla i v upravování dat citlivosti k PTC k věku a pohlaví. Předchozí studie (Campbell et al., 2012) používající tuto metodu odečítá u všech žen ve vzorci hodnotu 0,73, jelikož se udává, že právě o tento stupeň ředění jsou při použití této metody ženy citlivější k PTC než muži (Harris & Kalmus, 1951; Prodi et al., 2004). V mé studii je použita jiná metoda determinace citlivosti k PTC, a proto nemohla být ve vzorci odečítána tato hodnota. Místo toho byla odečtena hodnota 0,146673, která udává průměrnou hladinu, o kterou jsou ženy citlivější k PTC než muži. Tuto hodnotu je ale nutné ověřit dalšími výzkumy za použití stejné metody determinace citlivosti k PTC, jelikož je možné, že v rámci mé práce nebyl zastoupen náhodný soubor jedinců a data by tedy mohla být zkreslená. Pro budoucí výzkumy by bylo vhodné sjednotit metodu determinace citlivosti k PTC a tím pádem i rovnici pro úpravu dat k věku a pohlaví, aby byla všechna získaná data jednotná. I přes to ale výsledky Kruskal-Wallisova testu ukazují, že genotypy genu *TAS2R38* jsou u zkoumaných afrických populací velice dobrým prediktorem citlivosti k PTC, jak rovněž vyplývá z výsledků stejného testu v jiné studii (Campbell et al., 2012).

### 11.3 Vliv typu subsistence na varianty genu *TAS2R38*

Další oblastí, na kterou se má diplomová práce zaměřuje, je vliv různých subsistenčních strategií na varianty genu *TAS2R38*. Je známo, že receptory *TAS2R38* úzce souvisí se stravou a že v Africe můžeme pozorovat různé lokální adaptace v reakci na typ stravy (Tishkoff et al., 2007). Na základě toho byla vyslovena hypotéza, že by africké populace, které upřednostňují rozdílné typy subsistence, mohly mít v genomu zastoupeny různé frekvence genetických variant genu *TAS2R38* (Campbell et al., 2012).

Sami autoři této myšlenky ale pozorovali v genu *TAS2R38* u afrických populací praktikujících různé typy subsistence (lovci-sběrači, pastevci a zemědělci) velice podobné haplotypové frekvence. Konkrétně u haplotypu PAV se jeho frekvence u populací střední a východní Afriky pohybovaly mezi 0,387 až 0,552 a mezi 0,413 až 0,667, respektive. Haplotyp AVI dosahoval frekvencí kolem 0,2 až 0,3 jak na východě, tak i ve střední Africe. Haplotyp AAI tam můžeme naopak pozorovat ve frekvencích mezi 0,154 až 0,242 a ve východní Africe v rozmezí 0,053 až 0,221 (Campbell et al., 2012).

Ke stejnému závěru dospěla i má práce. Porovnání haplotypů s vysokou frekvencí (H01, H02 a H03, respektive PAV, AVI a AAI) mezi mauritánskými populacemi naznačilo, že jejich rozložení mezi pastevci (Maurové a Fulbové) a zemědělci (Soninkové) je rovnoměrné. Co se týče zastoupení haplotypu H01, u Soninků ho pozorujeme ve frekvencích cca 0,38, stejně jako u Maurů. Haplotypy H02 a H03 mají naopak stejné zastoupení jak u Soninků, tak u Fulbů (H02 – 0,347 a 0,369, H03 – 0,112 a 0,13). Rovnoměrné rozložení potvrdila i mnou provedená  $F_{ST}$  analýza, která ukázala, že se tyto populace v genu *TAS2R38* nijak neliší. Haplotypové variace v genu *TAS2R38* tedy nijak nesouvisí se stravou a můžeme tedy konstatovat, že přijetí jedné z alternativních subsistenčních strategií nemělo na rozložení alel a haplotypů mezi populacemi nijak významný vliv.

Obdobné frekvence variant genu *TAS2R38* u mauritánských pastevců a zemědělců nejsou moc překvapivé, jelikož je známo, že tato oblast byla v neolitu obývána agropastevci, kteří si udržovali širší subsistenční portfolio. Tyto subsistence tedy nebyly nijak pevně odděleny, a to zejména vlivem klimatu a prostředí, které tamním obyvatelům znemožnilo zaměřit se pouze na jeden způsob obživy (Holl, 2009).

## 11.4 Působení přírodního výběru

Tato práce se rovněž zaměřuje na přírodní výběr a jeho působení na gen *TAS2R38* u populací Mauritánie. Kladné hodnoty Tajimova  $D$  u mauritánských populací, které naznačují působení balancující selekce, jsou v souladu s výsledky jiných výzkumů (Campbell et al., 2012; Wooding et al., 2004). V těchto výzkumech jsou ale  $D$  hodnoty považovány za statisticky signifikantní, na rozdíl od mé práce a výzkumu Rissa et al. (2016), kde nebylo statistické významnosti dosaženo ani u jedné z populací.

Ve studii z roku 2004 dosáhl gen *TAS2R38* statisticky signifikantních hodnot Tajimovy  $D$  statistiky pouze za předpokladu populační expanze. Konkrétně bylo uvažováno až tisícínásobné zvětšení populace, které se odehrálo v době před 10 tisíci až 200 tisíci lety (Wooding et al., 2004). Následná studie (Wang et al., 2004) naopak uvádí, že tento model produkuje falešně pozitivní  $D$  hodnoty a bezpečnějším způsobem zjištění efektu balancující selekce je testování za předpokladu konstantní velikosti populace, a to zejména proto, že podrobnosti o lidské expanzi jsou stále nejasné.

I přes to byl ale obdobný model použit i ve studii z roku 2012, kde bylo u afrických i mimoafrických populací dosaženo odchylky od neutrality pouze při použití koalescenční simulace (Hudson et al., 1992) za předpokladu mírného růstu populací; za neutrality a konstantní velikosti populace zůstávaly hodnoty testu statisticky nesignifikantní (Campbell et al., 2012). U afrických populací byly statisticky signifikantní hodnoty dosaženy v několika případech. Jedním z nich byl předpoklad dvacetinásobného zvětšení populace z původní efektivní velikosti 10 tisíců jedinců, které započalo před cca 70 tisíci lety a trvá dodnes. Další možnost byla podobná, jediným rozdílem byl předpoklad čtyřicetinásobného zvětšení populace. Poslední možností bylo působení efektu hrdla láhve, které způsobilo pokles populační velikosti z 10 tisíc na 3 tisíce jedinců. Tento efekt měl vliv před 60 tisíci lety a byl následován desetinasobným zvětšením populace trvajícím od doby před 50 tisíci lety dodnes. U mimoafrických populací bylo odchylky od neutrality dosaženo opět modelem efektu hrdla láhve, tentokrát následovaného čtyřicetinásobným zvětšením populace (Campbell et al., 2012).

V poslední uvedené studii byly zároveň  $D$  hodnoty afrických populací o něco nižší než u mimoafrických populací, což autoři připisují přebytku vzácných nesynonymních variant u afrických populací (Campbell et al., 2012). Obdobně jako v této studii, i v rámci mnou



zkoumaných mauritánských populací můžeme pozorovat zvýšené zastoupení variant s nízkou frekvencí. U nejvíce diverzifikované populace Soninků s osmi polymorfními pozicemi vidíme nejnižší  $D$  hodnoty a zároveň záporné hodnoty  $F_s$ , naopak u nejméně diverzifikovaných Fulbů dosahuje  $D$  podobných hodnot (1,825) jako u mimoafrických populací (Campbell et al., 2012).

Vyšší hodnoty  $D$  by u mimoafrických populací mohly být způsobeny ztrátou haplotypových variant kvůli efektu zakladatele působícího těsně před expanzí anatomicky moderních lidí z Afriky (Campbell et al., 2012; Campbell & Tishkoff, 2010). Obdobné hodnoty u Fulbů, stejně jako kladné  $F$  hodnoty by mohly znamenat snížení efektivní velikosti, tentokrát ale působením efektu hrdla láhve i u této pastevecké populace. Zároveň bylo navrženo, že by za zvýšeným zastoupením variant s nízkou frekvencí u afrických populací mohl stát nedávný selekční tlak, který by upřednostnil zvýšení počtu nesynonymních mutací oproti mutacím synonymním (Campbell et al., 2012).

Model balancující selekce naopak nepodpořil výzkum z roku 2004, který zaznamenal v genu *TAS2R38* relaxaci selekčních sil. Tento výzkum se ale zaměřoval pouze na 22 jedinců z různých světových populací (Wang et al., 2004). K obdobným výsledkům dospěla i následná studie, která stejně jako moje diplomová práce neidentifikovala žádnou statisticky signifikantní  $D$  hodnotu u zkoumaných populací (Risso et al., 2016). Autoři této studie uvádějí, že  $D$  hodnoty pro gen *TAS2R38* jsou velice podobné hodnotám pozorovaných u evolučně neutrálních lokusů (Wall et al., 2008; Zhao et al., 2000), a tento gen by tedy mohl být považován za evolučně neutrální (Risso et al., 2016). Zároveň zohledňují i demografické události pomocí MFDM testu, který také neukázal statisticky signifikantní hodnoty, což naznačuje, že právě tyto události by mohly stát za kladnými hodnotami Tajimovy  $D$  statistiky (Risso et al., 2016).

K výše uvedené možnosti se přiklánějí i výsledky mé práce, kde MFDM analýza rovněž nedosáhla statistické významnosti. U populace Fulbů dosáhla tato analýza dokonce hodnoty 1,000, což může být způsobeno korekcí a zaokrouhlením čísla v programu, případně tím, že mnou použitý vzorek nebyl dostatečně reprezentativní. Jednotlivci v populaci Fulbů si mohou být geneticky hodně podobní, což je viditelné i na nízkých hodnotách diverzity. Kladné  $D$  hodnoty by tedy mohly být způsobeny demografickými událostmi, které nemají na MFDM test vliv, například změnou efektivní velikosti populace nebo i vyšší mírou

populační struktury či naopak mísením populací. To by nebylo velkým překvapením, neboť Fulbové jsou známi vyšší mírou endogamie (Hampshire & Smith, 2001).

Výsledky žádného z testů selekční neutrality nedosáhly u mnou zkoumaných mauritánských populací statistické významnosti a zároveň ukázaly velice rozdílné výsledky, které je poměrně náročné interpretovat. Například u populace Maurů by se výsledky testů daly objasnit jak balancující selekcí či efektem hrdla láhve a snížením efektivní velikosti populace, tak i pozitivní či direkcionalní selekcí, populační expanzí a genetickým draftem. U Soninků je na základě  $F_s$ ,  $H$  a  $F$  hodnot možné uvažovat o působení direkcionalní či pozitivní selekce, genetického draftu, či populační expanze. Naopak u Fulbů naznačují  $H$  a  $F$  hodnoty spíše balancující selekci, působení efektu hrdla láhve či snížení efektivní velikosti populace. Žádný z testů selekční neutrality ale neukázal statisticky signifikantní hodnoty a v literatuře často zmiňovaný model balancující selekce tedy nelze na základě mých zjištění přijmout ani vyloučit. Je ale pravděpodobné, že v současné době už na gen *TAS2R38* v Africe selekce nepůsobí, či došlo k její relaxaci, jelikož odchylku od neutrality neukázaly ani další metody, které byly použity ke zjištění působení selekce na gen *TAS2R38* v dřívější studii. Jako příklad můžeme uvést Bayesovskou statistiku či Hudson-Kreitman-Aguadé (HKA) test (Risso et al., 2016).

Působení přírodního výběru na geny kódující receptory hořké chuti se věnovala i studie Kulichové et al. (2022), která se konkrétně zaměřovala na gen *TAS2R16*. Tento gen byl testován celkem u 19 populací v celém prostoru sahelu. Výsledky tohoto výzkumu ukazují, že gen *TAS2R16*, stejně jako gen *TAS2R38*, není v sahelo-súdánském pásmu pod selekčním tlakem, ačkoli předchozí výsledky takovou možnost naznačovaly (Campbell et al., 2014; Soranzo et al., 2005).

Pokud všechny poznatky shrneme, je možné, že balancující selekce působila na gen *TAS2R38* v prvotních stádiích vývoje homininů před expanzí moderního člověka z Afriky (Risso et al., 2016) a postupně začala ztrácet na síle (Wang et al., 2004). Díky relaxaci selekčních sil, efektu hrdla láhve a populační expanzi došlo pak mimo Afriku ke zvýšení zastoupení haplotypů PAV a AVI (Risso et al., 2016). Naopak v Africe začala na gen pravděpodobně působit rozrůžňující selekce, která zvýšila frekvenci nesynonymních variant a zároveň i haplotypů s nízkou frekvencí výskytu (Campbell et al., 2012).

## 12 Závěr

Tato diplomová práce analyzuje polymorfismy v genu *TAS2R38* u populací Mauritánie s odlišnou subsistenční historií, jejich asociaci s vnímáním hořké chuti PTC a rovněž působení přírodního výběru. Práce zpracovává 147 vzorků slin získaných od tří populací, které dosud nebyly zkoumány v žádné z předchozích studií, neboť jejich vzorky byly získány teprve nedávným výzkumem.

Sekvence exonu *TAS2R38* a následné analýzy potvrdily poznatky dřívějších výzkumů (Campbell et al., 2012; Risso et al., 2016), které v tomto genu pozorovaly u afrických populací zvýšenou genovou a nukleotidovou diverzitu. U afrických populací se tedy můžeme setkat s větším množstvím polymorfních míst a haplotypů oproti zbytku světa, kde jsou ve větší míře zastoupeny pouze haplotypy PAV a AVI (Risso et al., 2016). I přes poměrně malý počet jedinců z blízkých lokalit jižní Mauritánie se mi podařilo sekvenováním detekovat celkem deset mutací typu SNPs, na jejichž základě jsem rekonstruovala 16 haplotypů. Zároveň se v mém souboru vyskytlo všech osm možných haplotypů podmíněných záměnami na nukleotidových pozicích 145, 785 a 886, i když některé jen u relativně malého počtu jedinců.

Kromě vyšší genové a nukleotidové diverzity můžeme v Africe pozorovat v genu *TAS2R38* i vyšší fenotypovou diverzitu (Campbell et al., 2012). Je to dáno výskytem většího množství haplotypů a genotypů, které podmiňují tu či onu citlivost k PTC. V rámci mnou zkoumaného souboru se vyskytlo celkem 14 různých genotypů, z nichž pět nebylo pozorováno v žádné předchozí studii. Kruskal-Wallisův test rovněž ukázal, že genotypy genu *TAS2R38* jsou u zkoumaných afrických populací velice dobrým prediktorem citlivosti k PTC. Zároveň se mnou použitá metoda testování citlivosti k PTC ukázala u majoritních haplotypů jako celkem spolehlivá, jelikož potvrdila, že PAV je haplotypem chutnačství a AVI naopak haplotypem nechutnačství.

Jelikož byla oblast Mauritánie v neolitu obývána agropastevci s širším subsistenčním portfoliem (Holl, 2009), nebylo překvapením, že následné analýzy věnující se vlivu subsistence na varianty genu *TAS2R38* ukázaly, že tyto varianty nejsou typem stravy v současné době nijak ovlivněny. Přijetí jedné z alternativních subsistenčních strategií

afrického sahelu tedy nemělo na rozložení alel a haplotypů mezi mnou zkoumanými populacemi žádný vliv.

Co se týče působení přírodního výběru, nelze na základě mnou provedených analýz u vzorků mauritánských populací, které jsem měla k dispozici, přijmout model balancující selekce (Wooding et al., 2004). Žádný z testů selekční neutrality totiž neukázal statisticky významnou odchylku od neutrality. Je ale pravděpodobné, že v současné době už na gen *TAS2R38* v západní Africe balancující selekce nepůsobí, či dochází k její relaxaci, jak bylo navrženo i v některých předchozích studiích (Risso et al., 2016; Wang et al., 2004).

Gen *TAS2R38* a jeho souvislost s citlivostí k PTC je v dnešní době stále velice zkoumaným fenoménem. Častou otázkou výzkumů je zejména evoluční role haplotypu AVI, která stále není úplně pochopená. Je možné, že význam tohoto haplotypu není patrný pouze v oblasti chuti a stravy, ale mohl být důležitý i při detekci endogenních sloučenin, jako jsou například sloučeniny produkované mikrobiotou nebo metabolity v orgánech, kde jsou tyto receptory exprimovány (Risso et al. 2021).

Jako další příklad můžeme uvést virové onemocnění COVID-19, k jehož hlavním symptomům patří ztráta chuti, tzv. ageusie (Vaira et al., 2020). Nedávná studie ukázala, že u pacientů s tímto onemocněním je nejvíce narušena sladká a hořká chuť (Huart et al., 2020), které jsou podmíněné receptory TAS1R a TAS2R (Chandrashekar et al., 2000; Nelson et al., 2001). Novější studie uvádí, že gen *TAS2R38* se zdá být dobrým kandidátem pro budoucí studium patofyziologie tohoto onemocnění (Parsa et al., 2021). Varianty v genu *TAS2R38* by tedy mohly nést určité predispozice k bakteriálním či virovým infekcím nebo na ně přímo odpovídat (Risso et al., 2021), což je zajímavá a inspirující hypotéza, která vyžaduje další testování.

## 13 Seznam zkratek

A	adenin
A262V	záměna alaninu a valinu na pozici 262
AAI	haplotyp alanin, alanin, izoleucin
AAV	haplotyp alanin, alanin, valin
AHACI	haplotyp alanin, histidin, alanin, cystein, izoleucin
AK	aminokyselina
ARARI	haplotyp alanin, arginin, alanin, arginin, izoleucin
AV ČR	Akademie věd České republiky
AVI	haplotyp alanin, valin, izoleucin
AVV	haplotyp alanin, valin, valin
C	cytosin
COVID-19	koronavirové onemocnění 2019
<i>D</i>	Tajimova <i>D</i> statistika
$D_{ii}$	průměrný počet párových rozdílů
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DnaSP	DNA Sequence Polymorphism
dNTPs	deoxynukleosidtrifosfáty
EM	Expectation-Maximization
<i>F</i>	Ewens-Wattersonův test homozygotity
FMA	Fulbové
$F_s$	Fuova $F_s$ statistika
$F_{ST}$	fixační index
G	guanin
G417T	záměna guaninu a thyminu na pozici 417
GPCRs	receptory spřažené s G-proteiny
<i>h</i>	genová diverzita
<i>H</i>	Fayova a Wuova <i>H</i> statistika
H01-16	haplotyp 01-16
HKA	Hudson-Kreitman-Aguadé test

k	počet haplotypů
MFDM	Maximum Frequency of Derived Mutations
MgCl <sub>2</sub>	chlorid hořečnatý
MOO	Maurové
n	počet jedinců v populaci
OG-L2P	Oragene Purifier
<i>p</i>	p-hodnota
P49A	záměna prolinu a alaninu na pozici 49
PAI	haplotyp prolin, alanin, izoleucin
PAV	haplotyp prolin, alanin, valin
PCR	polymerázová řetězová reakce
PopART	Population Analysis with Reticulate Trees
PROP	6-n-propylthiouracil
PTC	fenylthiokarbamid
PVI	haplotyp prolin, valin, izoleucin
PVV	haplotyp prolin, valin, valin
RNA	ribonukleová kyselina
SNK	Soninkové
SNPs	jednonukleotidové polymorfismy
T	thymin
<i>TAS1R/T1R</i>	genová rodina chuťových receptorů typu 1
TAS1R	třída chuťových receptorů typu 1
<i>TAS2R/T2R</i>	genová rodina chuťových receptorů typu 2
TAS2R	třída chuťových receptorů typu 2
TBE	tris-borátový pufr
TE	Tris-HCl/EDTA
UV	ultrafialový
V296I	záměna valinu a izoleucinu na pozici 296
$\pi$	nukleotidová diverzita

## 14 Seznam použité literatury

- Adler, E., Hoon, M. A., Mueller, K. L., Chandrashekar, J., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2000). A novel family of mammalian taste receptors. *Cell*, *100*(6), 693–702.
- Bandelt, H.-J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, *16*(1), 37–48.
- Barnicot, N. A., Harris, H., & Kalmus, H. (1951). Taste thresholds of further eighteen compounds and their correlation with PTC thresholds. *Annals of Eugenics*, *16*(1), 119–128.
- Behrens, M., Brockhoff, A., Kuhn, C., Bufe, B., Winnig, M., & Meyerhof, W. (2004). The human taste receptor hTAS2R14 responds to a variety of different bitter compounds. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *319*(2), 479–485.
- Brockhoff, A., Behrens, M., Massarotti, A., Appendino, G., & Meyerhof, W. (2007). Broad tuning of the human bitter taste receptor hTAS2R46 to various sesquiterpene lactones, clerodane and labdane diterpenoids, strychnine, and denatonium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(15), 6236–6243.
- Bufe, B., Breslin, P. A., Kuhn, C., Reed, D. R., Tharp, C. D., Slack, J. P., Kim, U.-K., Drayna, D., & Meyerhof, W. (2005). The molecular basis of individual differences in phenylthiocarbamide and propylthiouracil bitterness perception. *Current Biology*, *15*(4), 322–327.
- Bufe, B., Hofmann, T., Krautwurst, D., Raguse, J.-D., & Meyerhof, W. (2002). The human TAS2R16 receptor mediates bitter taste in response to  $\beta$ -glucopyranosides. *Nature Genetics*, *32*(3), 397–401.
- Campbell, M. C., Ranciaro, A., Froment, A., Hirbo, J., Omar, S., Bodo, J.-M., Nyambo, T., Lema, G., Zinshteyn, D., Drayna, D., Breslin, P. A. S., & Tishkoff, S. A. (2012). Evolution of Functionally Diverse Alleles Associated with PTC Bitter Taste Sensitivity in Africa. *Molecular Biology and Evolution*, *29*(4), 1141–1153.
- Campbell, M. C., Ranciaro, A., Zinshteyn, D., Rawlings-Goss, R., Hirbo, J., Thompson, S., Woldemeskel, D., Froment, A., Rucker, J. B., & Omar, S. A. (2014). Origin and differential selection of allelic variation at TAS2R16 associated with salicin bitter taste sensitivity in Africa. *Molecular Biology and Evolution*, *31*(2), 288–302.
- Campbell, M. C., & Tishkoff, S. A. (2010). The evolution of human genetic and phenotypic variation in Africa. *Current Biology*, *20*(4), R166–R173.
- Carlson, D. G., Daxenbichler, M. E., VanEtten, C. H., Kwolek, W. F., & Williams, P. H. (1987). Glucosinolates in crucifer vegetables: Broccoli, Brussels sprouts, cauliflower, collards, kale, mustard greens, and kohlrabi. *Journal of American Society for Horticultural Science*, *112*(1), 173–178.
- Carrai, M., Steinke, V., Vodicka, P., Pardini, B., Rahner, N., Holinski-Feder, E., Morak, M., Schackert, H. K., Görgens, H., & Stemmler, S. (2011). Association between TAS2R38

- gene polymorphisms and colorectal cancer risk: A case-control study in two independent populations of Caucasian origin. *PLOS One*, 6(6), e20464.
- Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Hoon, M. A., Adler, E., Feng, L., Guo, W., Zuker, C. S., & Ryba, N. J. P. (2000). T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell*, 100(6), 703–711.
- Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2016). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 44(Database issue), D67–D72.
- Conte, C., Ebeling, M., Marcuz, A., Nef, P., & Andres-Barquin, P. J. (2002). Identification and characterization of human taste receptor genes belonging to the TAS2R family. *Cytogenetic and Genome Research*, 98(1), 45–53.
- Černý, V., Hájek, M., Bromová, M., Čmejla, R., Diallo, I., & Brdička, R. (2006). MtDNA of Fulani Nomads and Their Genetic Relationships to Neighboring Sedentary Populations. *Human Biology*, 78(1), 9–27.
- Černý, Viktor. (2006). *Lidé od Čadského jezera*. Academia.
- Černý, Viktor, Pereira, L., Musilová, E., Kujanová, M., Vašíková, A., Blasi, P., Garofalo, L., Soares, P., Diallo, I., Brdička, R., & Novelletto, A. (2011). Genetic Structure of Pastoral and Farmer Populations in the African Sahel. *Molecular Biology and Evolution*, 28(9), 2491–2500.
- Desai, H., Smutzer, G., Coldwell, S. E., & Griffith, J. W. (2011). Validation of edible taste strips for identifying PROP taste recognition thresholds. *The Laryngoscope*, 121(6), 1177–1183.
- Dotson, C. D., Zhang, L., Xu, H., Shin, Y.-K., Vignes, S., Ott, S. H., Elson, A. E. T., Choi, H. J., Shaw, H., & Egan, J. M. (2008). Bitter taste receptors influence glucose homeostasis. *PLOS One*, 3(12), e3974.
- Drayna, D. (2005). Human taste genetics. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 6, 217–235.
- Drayna, D., Coon, H., Kim, U.-K., Elsner, T., Cromer, K., Otterud, B., Braid, L., Peiffer, A. P., & Leppert, M. (2003). Genetic analysis of a complex trait in the Utah Genetic Reference Project: A major locus for PTC taste ability on chromosome 7q and a secondary locus on chromosome 16p. *Human Genetics*, 112(5), 567–572.
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564–567.
- Excoffier, L., & Slatkin, M. (1995). Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Molecular Biology and Evolution*, 12(5), 921–927.
- Fahey, J. W., Zhang, Y., & Talalay, P. (1997). Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(19), 10367–10372.



- Fairley, S., Lowy-Gallego, E., Perry, E., & Flicek, P. (2020). The International Genome Sample Resource (IGSR) collection of open human genomic variation resources. *Nucleic Acids Research*, 48(Database issue), D941–D947.
- Fay, J. C., & Wu, C.-I. (2000). Hitchhiking under positive Darwinian selection. *Genetics*, 155(3), 1405–1413.
- Fenwick, G. R., Heaney, R. K., Mullin, W. J., & VanEtten, C. H. (1983). Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 18(2), 123–201.
- Fischer, A., Gilad, Y., Man, O., & Pääbo, S. (2005). Evolution of bitter taste receptors in humans and apes. *Molecular Biology and Evolution*, 22(3), 432–436.
- Fisher, R. A., Ford, E. B., & Huxley, J. (1939). Taste-testing the anthropoid apes. *Nature*, 144(3652), 750–750.
- Fox, A. L. (1932). The relationship between chemical constitution and taste. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 18(1), 115.
- Fox, J. (2005). The R Commander: A basic-statistics graphical user interface to R. *Journal of Statistical Software*, 14, 1–42.
- Fu, Y.-X. (1996). New statistical tests of neutrality for DNA samples from a population. *Genetics*, 143(1), 557–570.
- Fu, Y.-X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2), 915–925.
- Gilbertson, T. A., Damak, S., & Margolskee, R. F. (2000). The molecular physiology of taste transduction. *Current Opinion in Neurobiology*, 10(4), 519–527.
- Goren-Inbar, N., Alpers, N., Kislev, M. E., Simchoni, O., Melamed, Y., Ben-Nun, A., & Werker, E. (2004). Evidence of hominin control of fire at Gesher Benot Yaaqov, Israel. *Science*, 304(5671), 725–727.
- Greene, L. S. (1974). Physical growth and development, neurological maturation, and behavioral functioning in two Ecuadorian Andean communities in which goiter is endemic. II. PTC taste sensitivity and neurological maturation. *American Journal of Physical Anthropology*, 41(1), 139–151.
- Grosz-Ngaté, M. L., Hanson, J. H., & O'Meara, P. (2014). *Africa*, Fourth edition. Indiana University Press.
- Guenther, P. M., Dodd, K. W., Reedy, J., & Krebs-Smith, S. M. (2006). Most Americans eat much less than recommended amounts of fruits and vegetables. *Journal of the American Dietetic Association*, 106(9), 1371–1379.
- Haldane, J. B. S. (1949). The rate of mutation of human genes. *Hereditas*, 35(S1), 267–273.
- Hall, T. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Hampshire, K. R., & Smith, M. T. (2001). Consanguineous marriage among the Fulani. *Human Biology*, 597–603.

- Harris, H., & Kalmus, H. (1951). The distribution of taste thresholds for phenylthiourea of 384 sib pairs. *Annals of Eugenics*, *16*(1), 226–230.
- Hellfritsch, C., Brockhoff, A., Stähler, F., Meyerhof, W., & Hofmann, T. (2012). Human psychometric and taste receptor responses to steviol glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(27), 6782–6793.
- Holl, A. (1985a). Background to the Ghana Empire: Archaeological investigations on the transition to statehood in the Dhar Tichitt region (Mauritania). *Journal of Anthropological Archaeology*, *4*(2), 73–115.
- Holl, A. (1985b). Subsistence patterns of the Dhar Tichitt Neolithic, Mauritania. *African Archaeological Review*, *3*(1), 151–162.
- Holl, A. (2009). Coping with uncertainty: Neolithic life in the Dhar Tichitt-Walata, Mauritania, (ca. 4000–2300 BP). *Comptes Rendus Geoscience*, *341*(8–9), 703–712.
- Hoon, M. A., Adler, E., Lindemeier, J., Battey, J. F., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (1999). Putative mammalian taste receptors: A class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell*, *96*(4), 541–551.
- Howe, K. L., Achuthan, P., Allen, J., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Amode, M. R., Armean, I. M., Azov, A. G., Bennett, R., & Bhai, J. (2021). Ensembl 2021. *Nucleic Acids Research*, *49*(Database issue), D884–D891.
- Huart, C., Philpott, C., Konstantinidis, I., Altundag, A., Trecca, E. M. C., Cassano, M., Rombaux, P., & Hummel, T. (2020). Comparison of COVID-19 and common cold chemosensory dysfunction. *Rhinology*, *58*(6), 623–625.
- Hudson, R. R., Slatkin, M., & Maddison, W. P. (1992). Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, *132*(2), 583–589.
- Ikeda, K. (2002). New Seasonings. *Chemical Senses*, *27*(9), 847–849.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, *28*(12).
- Kim, U.-K., Jorgenson, E., Coon, H., Leppert, M., Risch, N., & Drayna, D. (2003). Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide. *Science*, *299*(5610), 1221–1225.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, *16*(2), 111–120.
- Kohl, S., Behrens, M., Dunkel, A., Hofmann, T., & Meyerhof, W. (2013). Amino acids and peptides activate at least five members of the human bitter taste receptor family. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(1), 53–60.

- Konner, M., & Eaton, S. B. (2010). Paleolithic nutrition: Twenty-five years later. *Nutrition in Clinical Practice, 25*(6), 594–602.
- Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association, 47*(260), 583–621.
- Kulichová, I., Mouterde, M., Mokhtar, M. G., Diallo, I., Tříška, P., Diallo, Y. M., Hofmanová, Z., Poloni, E. S., & Černý, V. (2022). Demographic history was a formative mechanism of the genetic structure for the taste receptor TAS2R16 in human populations inhabiting Africa's Sahel/Savannah Belt. *American Journal of Biological Anthropology, 177*(3), 540–555.
- Lalueza-Fox, C., Gigli, E., de la Rasilla, M., Fortea, J., & Rosas, A. (2009). Bitter taste perception in Neanderthals through the analysis of the TAS2R38 gene. *Biology Letters, 5*(6), 809–811.
- Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). popart: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution, 6*(9), 1110–1116.
- Leonard, W. R. (2003). Food for thought: Dietary change was a driving force in human evolution. *Scientific American, 13*, 62–71.
- Levit, A., Nowak, S., Peters, M., Wiener, A., Meyerhof, W., Behrens, M., & Niv, M. Y. (2014). The bitter pill: Clinical drugs that activate the human bitter taste receptor TAS2R14. *The FASEB Journal, 28*(3), 1181–1197.
- Li, H. (2011). A new test for detecting recent positive selection that is free from the confounding impacts of demography. *Molecular Biology and Evolution, 28*(1), 365–375.
- Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K., Zoller, M., & Adler, E. (2002). Human receptors for sweet and umami taste. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 99*(7), 4692–4696.
- Liao, J., & Schultz, P. G. (2003). Three sweet receptor genes are clustered in human chromosome 1. *Mammalian Genome, 14*(5), 291–301.
- Lossow, K., Hübner, S., Roudnitzky, N., Slack, J. P., Pollastro, F., Behrens, M., & Meyerhof, W. (2016). Comprehensive Analysis of Mouse Bitter Taste Receptors Reveals Different Molecular Receptive Ranges for Orthologous Receptors in Mice and Humans. *The Journal of Biological Chemistry, 291*(29), 15358–15377.
- Maley, J., & Vernet, R. (2015). Populations and climatic evolution in north tropical Africa from the end of the Neolithic to the dawn of the modern era. *African Archaeological Review, 32*(2), 179–232.
- Mancuso, G., Borgonovo, G., Scaglioni, L., & Bassoli, A. (2015). Phytochemicals from *Ruta graveolens* activate TAS2R bitter taste receptors and TRP channels involved in gustation and nociception. *Molecules, 20*(10), 18907–18922.
- Mares, M. A. (2017). *Encyclopedia of deserts*. University of Oklahoma Press.

- Mennella, J. A., Pepino, M. Y., Duke, F. F., & Reed, D. R. (2011). Psychophysical dissection of genotype effects on human bitter perception. *Chemical Senses*, *36*(2), 161–167.
- Meyerhof, W., Batram, C., Kuhn, C., Brockhoff, A., Chudoba, E., Bufe, B., Appendino, G., & Behrens, M. (2010). The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chemical Senses*, *35*(2), 157–170.
- Mighell, A. J., Smith, N. R., Robinson, P. A., & Markham, A. F. (2000). Vertebrate pseudogenes. *FEBS Letters*, *468*(2–3), 109–114.
- Milton, K. (2003). The critical role played by animal source foods in human (Homo) evolution. *The Journal of Nutrition*, *133*(11), 3886S–3892S.
- Murillo, G., & Mehta, R. G. (2001). Cruciferous vegetables and cancer prevention. *Nutrition and Cancer*, *41*(1–2), 17–28.
- Ndukwe, P. I. (1995). *Fulani: (Cameroon, Mali, Nigeria)*. The Rosen Publishing Group, Inc.
- Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia university press.
- Nelson, G., Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Feng, L., Zhao, G., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2002). An amino-acid taste receptor. *Nature*, *416*(6877), 199–202.
- Nelson, G., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2001). Mammalian sweet taste receptors. *Cell*, *106*(3), 381–390.
- Nováčková, J., Čížková, M., Mokhtar, M. G., Duda, P., Stenzl, V., Tríska, P., Hofmanová, Z., & Černý, V. (2020). Subsistence strategy was the main factor driving population differentiation in the bidirectional corridor of the African Sahel. *American Journal of Physical Anthropology*, *171*(3), 496–508.
- Nwanunobi, C. O. (1996). *Soninke*. The Rosen Publishing Group.
- Parsa, S., Mogharab, V., Ebrahimi, M., Ahmadi, S. R., Shahi, B., Mehramiz, N. J., Foroughian, M., Zarenezhad, M., Kalani, N., & Abdi, M. H. (2021). COVID-19 as a worldwide selective event and bitter taste receptor polymorphisms: An ecological correlational study. *International Journal of Biological Macromolecules*, *177*, 204–210.
- Pemberton, T. J., Mehta, N. U., Witonsky, D., Di Rienzo, A., Allayee, H., Conti, D. V., & Patel, P. I. (2008). Prevalence of common disease-associated variants in Asian Indians. *BMC Genetics*, *9*(1), 1–20.
- Phelps, L. N., Broennimann, O., Manning, K., Timpson, A., Jousse, H., Mariethoz, G., Fordham, D. A., Shanahan, T. M., Davis, B. A. S., & Guisan, A. (2020). Reconstructing the climatic niche breadth of land use for animal production during the African Holocene. *Global Ecology and Biogeography*, *29*(1), 127–147.
- Priehodová, E., Austerlitz, F., Čížková, M., Nováčková, J., Ricaut, F.-X., Hofmanová, Z., Schlebusch, C. M., & Černý, V. (2020). Sahelian pastoralism from the perspective of variants associated with lactase persistence. *American Journal of Physical Anthropology*, *173*(3), 423–436.

- Prodi, D. A., Drayna, D., Forabosco, P., Palmas, M. A., Maestrale, G. B., Piras, D., Pirastu, M., & Angius, A. (2004). Bitter taste study in a sardinian genetic isolate supports the association of phenylthiocarbamide sensitivity to the TAS2R38 bitter receptor gene. *Chemical Senses*, *29*(8), 697–702.
- Pronin, A. N., Xu, H., Tang, H., Zhang, L., Li, Q., & Li, X. (2007). Specific alleles of bitter receptor genes influence human sensitivity to the bitterness of aloin and saccharin. *Current Biology*, *17*(16), 1403–1408.
- Reynolds, J., Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1983). Estimation of the coancestry coefficient: Basis for a short-term genetic distance. *Genetics*, *105*(3), 767–779.
- Risso, D., Drayna, D., Tofanelli, S., & Morini, G. (2021). Open questions in sweet, umami, and bitter taste genetics. *Current Opinion in Physiology*, *20*, 174–179.
- Risso, D. S., Mezzavilla, M., Pagani, L., Robino, A., Morini, G., Tofanelli, S., Carrai, M., Campa, D., Barale, R., Caradonna, F., Gasparini, P., Luiselli, D., Wooding, S., & Drayna, D. (2016). Global diversity in the TAS2R38 bitter taste receptor: Revisiting a classic evolutionary PROposal. *Scientific Reports*, *6*(1), 25506.
- Risso, D., Sainz, E., Morini, G., Tofanelli, S., & Drayna, D. (2018). Taste perception of *Antidesma bunius* fruit and its relationships to bitter taste receptor gene haplotypes. *Chemical Senses*, *43*(7), 463–468.
- Roland, W. S., van Buren, L., Gruppen, H., Driesse, M., Gouka, R. J., Smit, G., & Vincken, J.-P. (2013). Bitter taste receptor activation by flavonoids and isoflavonoids: Modeled structural requirements for activation of hTAS2R14 and hTAS2R39. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(44), 10454–10466.
- Roland, W. S., Vincken, J.-P., Gouka, R. J., van Buren, L., Gruppen, H., & Smit, G. (2011). Soy isoflavones and other isoflavonoids activate the human bitter taste receptors hTAS2R14 and hTAS2R39. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(21), 11764–11771.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution*, *34*(12), 3299–3302.
- Sainz, E., Cavenagh, M. M., Gutierrez, J., Battey, J. F., Northup, J. K., & Sullivan, S. L. (2007). Functional characterization of human bitter taste receptors. *Biochemical Journal*, *403*(3), 537–543.
- Sandell, M. A., & Breslin, P. A. (2006). Variability in a taste-receptor gene determines whether we taste toxins in food. *Current Biology*, *16*(18), R792–R794.
- Shi, P., & Zhang, J. (2006). Contrasting modes of evolution between vertebrate sweet/umami receptor genes and bitter receptor genes. *Molecular Biology and Evolution*, *23*(2), 292–300.

- Smith, D. V., & Margolskee, R. F. (2001). Making sense of taste. *Scientific American*, 284(3), 32–39.
- Soares, S., Kohl, S., Thalmann, S., Mateus, N., Meyerhof, W., & De Freitas, V. (2013). Different phenolic compounds activate distinct human bitter taste receptors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(7), 1525–1533.
- Soranzo, N., Bufo, B., Sabeti, P. C., Wilson, J. F., Weale, M. E., Marguerie, R., Meyerhof, W., & Goldstein, D. B. (2005). Positive selection on a high-sensitivity allele of the human bitter-taste receptor TAS2R16. *Current Biology*, 15(14), 1257–1265.
- Stahl, A. B., Dunbar, R. I. M., Homewood, K., Ikawa-Smith, F., Kortlandt, A., McGrew, W. C., Milton, K., Paterson, J. D., Poirier, F. E., & Sugardjito, J. (1984). Hominid dietary selection before fire [and comments and reply]. *Current Anthropology*, 25(2), 151–168.
- Stephens, M., & Scheet, P. (2005). Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *The American Journal of Human Genetics*, 76(3), 449–462.
- Stephens, M., Smith, N. J., & Donnelly, P. (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *The American Journal of Human Genetics*, 68(4), 978–989.
- Stokes, J. (2009). *Encyclopedia of the Peoples of Africa and the Middle East*. Infobase Publishing.
- Tajima, F. (1983). Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105(2), 437–460.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585–595.
- Tajima, F. (1993). Measurement of DNA polymorphism. *Mechanisms of Molecular Evolution, Introduction to Molecular Paleopopulation Biology*, 37–59.
- Tepper, B. J. (1998). 6-n-Propylthiouracil: A genetic marker for taste, with implications for food preference and dietary habits. *American Journal of Human Genetics*, 63(5), 1271.
- Tepper, B. J. (2008). Nutritional implications of genetic taste variation: The role of PROP sensitivity and other taste phenotypes. *Annual Review of Nutrition*, 28, 367–388.
- Thalmann, S., Behrens, M., & Meyerhof, W. (2013). Major haplotypes of the human bitter taste receptor TAS2R41 encode functional receptors for chloramphenicol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 435(2), 267–273.
- Tishkoff, S. A., Reed, F. A., Ranciaro, A., Voight, B. F., Babbitt, C. C., Silverman, J. S., Powell, K., Mortensen, H. M., Hirbo, J. B., & Osman, M. (2007). Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. *Nature Genetics*, 39(1), 31–40.
- UNEP. (2008). *Africa: Atlas of Our Changing Environment, United Nations Environment Programme*. United Nations Environment Programme.

- UNEP. (2012). *Sahel Atlas of Changing Landscapes: Tracing trends and variations in vegetation cover and soil condition*. United Nations Environment Programme.
- Vaira, L. A., Salzano, G., Deiana, G., & De Riu, G. (2020). Anosmia and Ageusia: Common Findings in COVID-19 Patients. *The Laryngoscope*, *130*(7), 1787.
- Vernet, R. (2002). Climate during the late Holocene in the Sahara and the Sahel: Evolution and consequences on human settlement. In *Droughts, food and culture* (pp. 47–63). Springer.
- Vicente, M., Priehodová, E., Diallo, I., Podgorná, E., Poloni, E. S., Černý, V., & Schlebusch, C. M. (2019). Population history and genetic adaptation of the Fulani nomads: Inferences from genome-wide data and the lactase persistence trait. *BMC Genomics*, *20*(1), 1–12.
- Villesen, P. (2007). FaBox: An online toolbox for fasta sequences. *Molecular Ecology Notes*, *7*(6), 965–968.
- Wall, J. D., Cox, M. P., Mendez, F. L., Woerner, A., Severson, T., & Hammer, M. F. (2008). A novel DNA sequence database for analyzing human demographic history. *Genome Research*, *18*(8), 1354–1361.
- Wang, X., Thomas, S. D., & Zhang, J. (2004). Relaxation of selective constraint and loss of function in the evolution of human bitter taste receptor genes. *Human Molecular Genetics*, *13*(21), 2671–2678.
- Watterson, G. A. (1978). The homozygosity test of neutrality. *Genetics*, *88*(2), 405–417.
- Watterson, G. A. (1986). The homozygosity test after a change in population size. *Genetics*, *112*(4), 899–907.
- Weedall, G. D., & Conway, D. J. (2010). Detecting signatures of balancing selection to identify targets of anti-parasite immunity. *Trends in Parasitology*, *26*(7), 363–369.
- Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 1358–1370.
- Wooding, S., Bufe, B., Grassi, C., Howard, M. T., Stone, A. C., Vazquez, M., Dunn, D. M., Meyerhof, W., Weiss, R. B., & Bamshad, M. J. (2006). Independent evolution of bitter-taste sensitivity in humans and chimpanzees. *Nature*, *440*(7086), 930–934.
- Wooding, S., Kim, U.-K., Bamshad, M. J., Larsen, J., Jorde, L. B., & Drayna, D. (2004). Natural selection and molecular evolution in PTC, a bitter-taste receptor gene. *The American Journal of Human Genetics*, *74*(4), 637–646.
- Zhao, Z., Jin, L., Fu, Y.-X., Ramsay, M., Jenkins, T., Leskinen, E., Pamilo, P., Trexler, M., Pathy, L., & Jorde, L. B. (2000). Worldwide DNA sequence variation in a 10-kilobase noncoding region on human chromosome 22. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(21), 11354–11358.

## 15 Přílohy

**Příloha 1.** Hořké sloučeniny fungující jako ligandy genů *TAS2R*

Gen	Ligandy	
<i>TAS2R1</i>	přírodní	amarogentin, arborescin, chloramfenikol, izomery humulónu, johimbin, kaskarilin, parthenolid, pikrotoxinin, thiamin (Meyerhof et al., 2010), resveratrol (Lossow et al., 2016), L-fenylalanin, různé dipeptidy tryptofanu, leucinu, izoleucinu a fenylalaninu, tripeptid tryptofanu (Kohl et al., 2013)
	syntetické	cyklamát sodný, dextrometorfan, difenidol, difenylthiourea, thiokyanatan sodný (Meyerhof et al., 2010), cis-11-methyl-2-dodekanová kyselina, pyrokatechin, sukralóza (Lossow et al., 2016)
<i>TAS2R3</i>	přírodní	-
	syntetické	chlorochin (Meyerhof et al., 2010)
<i>TAS2R4</i>	přírodní	amarogentin, arborescin, artemorin, chinin, johimbin, kafr, kolchicin, kvasin, parthenolid (Meyerhof et al., 2010), epikatechin, taurocholová kyselina (Lossow et al., 2016), různé dipeptidy tryptofanu, leucinu, izoleucinu, prolinu a fenylalaninu, tripeptid leucinu a tryptofanu, D-tryptofan, L-tryptofan (Kohl et al., 2013), různé steviol-glykosidy (Hellfritsch et al., 2012)
	syntetické	azathioprin, dapson, denatonium-benzoát, difenidol, chlorfenamin (Meyerhof et al., 2010), 6-n-propylthiouracil (Chandrashekar et al., 2000), sukralóza (Lossow et al., 2016)
<i>TAS2R5</i>	přírodní	epikatechin (Lossow et al., 2016), pentagalloyl glukóza, prokyanidin C2 (Soares et al., 2013)
	syntetické	denatonium-sacharid, sukralóza (Lossow et al., 2016), 1,10-fenanthrolin (Meyerhof et al., 2010)



<i>TAS2R7</i>	přírodní	chinin, kofein, papaverin (Meyerhof et al., 2010), kreatinin (Lossow et al., 2016), malvidin-3-glukosid (Soares et al., 2013), strychnin (Sainz et al., 2007)
	syntetické	difenidol, chlorfenamin, kromolyn (Meyerhof et al., 2010), chlorochin (Sainz et al., 2007), sukralóza (Lossow et al., 2016)
<i>TAS2R8</i>	přírodní	chloramfenikol, parthenolid (Meyerhof et al., 2010)
	syntetické	denatonium-benzoát (Meyerhof et al., 2010), sacharin (Pronin et al., 2007), sukralóza (Lossow et al., 2016)
<i>TAS2R9</i>	přírodní	-
	syntetické	ofloxacin, pirenzepin, prokainamid (Dotson et al., 2008)
<i>TAS2R10</i>	přírodní	absintin, arborescin, arglabin, artemorin, brucin, erytromycin, chinin, chloramfenikol, johimbin, kafr, kaskarilin, kofein, kukurbitacin B, kukurbitacin E, kumarin, kvasin, papaverin, parthenolid, pikrotoxin, strychnin, thujon (Meyerhof et al., 2010), atropin, N-acyl homoserin laktony, kostunolid, kukurbitacin D, kukurbitacin I, spartein, tatrudin A (Lossow et al., 2016), bergapten, izopimpinelin, xantotoxin (Mancuso et al., 2015)
	syntetické	azathioprin, benzoin, cykloheximid, dapson, denatonium-benzoát, dextrometorfan, difenidol, famotidin, haloperidol, chlorfenamin, chlorochin (Meyerhof et al., 2010), santonin, sukralóza (Lossow et al., 2016)
<i>TAS2R13</i>	přírodní	-
	syntetické	denatonium-benzoát, difenidol (Meyerhof et al., 2010)
<i>TAS2R14</i>	přírodní	absintin, arborescin, arglabin, aristolochová kyselina, artemorin, falkarindiol, chinin, izomery humulónu, kafr, kaskarilin, kofein, kukurbitacin B, kumarin, kvasin, noskapin, papaverin, parthenolid, pikrotoxin, thujon (Meyerhof et al., 2010), androsteron, dokosaheptaenová

		<p>kyselina, genistein, N-acyl homoserin lakton, kostunolid, pantothenová kyselina, resveratrol, salicylová kyselina, tatrudin A, teobromin, umbeliferon (Lossow et al., 2016), apigenin, butein, datiscetin, dihydroxyflavony, dimethoxyflavony, 7,4-dimethoxyizoflavon, epigalokatechin galát, epikatechin galát, eriodiktyol, eriodiktyolchalkon, flavon, flavanon, floretin, fustin, herbacetin, homoeriodiktyol, hydroxymethoxyflavony, chalkon, chrysin, chrysoeriol, izorhamnetin, katechin, kemferol, kyanin chlorid, likviritigenin, luteolin, 6-methoxyluteolin, morin, myricetin, naringenin, pelargoninidin chlorid, pinocembrin, skutellarin, silibinin, sulfuretin, taxifolin, trihydroxyflavony, trihydroxychalkony, trimethoxyflavon, xanthon (Roland et al., 2013), biochanin A, daidzein, equol, formononetin, glycitein, 7-hydroxyizoflavon, izoflavon, kumestrol, prunetin, trihydroxyizoflavony (Roland et al., 2011), herbolid D (Brockhoff et al., 2007), hesperetin, kvercetin (Levit et al., 2014), izopimpinelin, skimianin, xantotoxin (Mancuso et al., 2015), piperonylová kyselina (Behrens et al., 2004), různé steviol-glykosidy (Hellfritsch et al., 2012), tripeptid tryptofanu (Kohl et al., 2013)</p>
	syntetické	<p>o-(p-anisoyl)benzoová kyselina, clonixin, 3,5-diiodosalicylová kyselina, diklofenak, glimepirid, malathion, mefenamová kyselina, mikonazol, niflumová kyselina, pantoprazol, pemirolast, salsalat (Levit et al., 2014), azathioprin, benzamid, benzoát sodný, benzoin, difenhydramin, difenidol, difenylthiourea, divinylsulfoxid, flufenamová kyselina, haloperidol, 4-hydroxyanisol, chlorfenamin, chlorhexidin, karisoprodol</p>

		(Meyerhof et al., 2010), benzofuran-2-karboxylová kyselina, 2-heptyl-3-hydroxychinolon, lidokain, 5-propyl-2-thiouracil, pyrokatechin, santonin (Lossow et al., 2016), 8-formyl-1-naftalenkarboxylová kyselina, naftoová kyselina, 1-nitronaftalen (Behrens et al., 2004)
<i>TAS2R16</i>	přírodní	amygdalin, arbutin, eskulin, helicin, D-salicin (Bufe et al., 2002), sinigrin (Meyerhof et al., 2010)
	syntetické	benzoát sodný, difenidol (Meyerhof et al., 2010), různé $\beta$ -D-glukopyranosidy (Bufe et al., 2002)
<i>TAS2R19 (48)</i>	přírodní	-
	syntetické	-
<i>TAS2R20 (49)</i>	přírodní	xantotoxin (Mancuso et al., 2015)
	syntetické	difenidol, kromolyn (Meyerhof et al., 2010)
<i>TAS2R30 (47)</i>	přírodní	absintin, amarogentin, andrografolid, artemorin, kafr, kaskarilin, kvasin, pikrotoxinin (Meyerhof et al., 2010)
	syntetické	denatonium-benzoát, difenidol (Meyerhof et al., 2010)
<i>TAS2R31 (44)</i>	přírodní	aloin (Pronin et al., 2007), aristolochová kyselina, chinin, parthenolid (Meyerhof et al., 2010), pantothenová kyselina (Lossow et al., 2016)
	syntetické	acesulfam draselný, difenidol, famotidin, sacharin (Meyerhof et al., 2010)
<i>TAS2R39</i>	přírodní	acetylgenistin, biochanin A, daidzein, equol, formononetin, genistein, genistin, glycitein, glycitin, 7-hydroxyizoflavon, kumestrol, malonylgenistin, trihydroxyizoflavony (Roland et al., 2011), amarogentin, chinin, chloramfenikol, kolchicin, thiamin (Meyerhof et al., 2010), apigenin, butein, datiscetin, dihydroxyflavony, 3,2-dihydroxychalkon, dimethoxyflavony, epigalokatechin, epikatechin galát, eriodiktyol, eriodiktyolchalkon, fisetin, flavon, floretin,

		fustin, genkwanin, gossypetin, herbacetin, homoeriodiktyol, hydroxyflavony, hydroxymethoxyflavon, chrysin, izorhamnetin, katechin, kemferol, kyanin chlorid, likviritigenin, luteolin, 6-methoxyluteolin, morin, myricetin, naringenin, pelargoninidin chlorid, pinocembrin, quercetagetin, resveratrol, silibinin, skutellarin, sulfuretin, taxifolin, tetrahydroxyflavon, tricetin, trihydroxyflavony, trihydroxychalkony, xanthon (Roland et al., 2013), epigalokatechin galát, epikatechin (Lossow et al., 2016), pentagalloyl glukóza, (Soares et al., 2013), různé dipeptidy tryptofanu, leucinu, izoleucinu a fenylalaninu, tripeptid tryptofanu, D-tryptofan (Kohl et al., 2013)
	syntetické	acetaminofenol, azathioprin, denatonium-benzoát, difenidol, chlorfenamin, chlorochin (Meyerhof et al., 2010), denatonium-sacharid, pyrokatechin, sukralóza (Lossow et al., 2016)
<i>TAS2R40</i>	přírodní	chinin, izomery humulónu (Meyerhof et al., 2010), pantothenová kyselina (Lossow et al., 2016)
	syntetické	dapson, difenhydramin, difenidol, chlorfenamin (Meyerhof et al., 2010), denatonium-sacharid (Lossow et al., 2016)
<i>TAS2R41</i>	přírodní	chloramfenikol (Thalmann et al., 2013)
	syntetické	sukralóza (Lossow et al., 2016)
<i>TAS2R42</i>	přírodní	-
	syntetické	-
<i>TAS2R43</i>	přírodní	aloin, amarogentin, arborescin, arglabin, aristolochová kyselina, falkarindiol, grosheimin, helicin, chinin, chloramfenikol, kofein (Meyerhof et al., 2010), pantothenová kyselina (Lossow et al., 2016)

	syntetické	acesulfam draselný, denatonium-benzoát, difenidol, kromolyn, sacharin (Meyerhof et al., 2010), denatonium-sacharid, epigalokatechin galát (Lossow et al., 2016)
<i>TAS2R45</i>	přírodní	-
	syntetické	-
<i>TAS2R46</i>	přírodní	absintin, amarogentin, andrografolid, arborescin, arglabin, artemorin, brucin, cnicin, grosheimin, chinin, chloramfenikol, johimbin, kaskarilin, kofein, kolchicin, krispolid, kvasin, parthenolid, pikrotoxin, strychnin, tatrudin B (Meyerhof et al., 2010), artemisinin, cynaropikrin, dihydro-aurin, epizaluzanin C, germakradien-6,11-dihydroxy-8,12-olid, herbolid A, herbolid D, herbolid D acetát, marubin, nobilin, parthenin, peroxy-artemorin, santamarin, sintenin, speciforin acetát, strychnin-N-oxid, tatrudin A acetát, taurin, teuflavin, teuflavosid, teumarin, umbelifolid, vulgarolid, zaluzanin D (Brockhoff et al., 2007), androsteron, atropin, berberin chlorid, kostunolid, kukurbitacin D, kukurbitacin I, progesteron, spartein, tatrudin A, xantotoxin (Lossow et al., 2016), tripeptid tryptofanu (Kohl et al., 2013)
	syntetické	azathioprin, denatonium-benzoát, difenidol, hydrokortizon, chlorfenamin, karisoprodol, orfenadrin (Meyerhof et al., 2010), santonin, sukralóza, sukrosa oktaacetát (Lossow et al., 2016)
<i>TAS2R50</i>	přírodní	amarogentin, andrografolid (Meyerhof et al., 2010)
	syntetické	-
<i>TAS2R60</i>	přírodní	-
	syntetické	-

**Příloha 2. Souhrn populací**

	<b>Maurové</b>	<b>Soninkové</b>	<b>Fulbové</b>
<b>Zkratka</b>	MOO	SNK	FMA
<b>Počet vzorků</b>	49	51	47
<b>Oblast</b>	Assaba	Gorgol	Gorgol
<b>Stát</b>	Mauritánie	Mauritánie	Mauritánie
<b>Zeměpisná délka</b>	-12,69	-12,89	-12,68
<b>Zeměpisná šířka</b>	16,87	15,66	16,25
<b>Jazyková rodina</b>	afro-asiatská	nigero-konžská	nigero-konžská
<b>Životní styl</b>	kočovní	usedlý	kočovní

### **Příloha 3. Izolační protokol**

1. Převrácením promíchat sliny a Oragene<sup>®</sup>•DNA roztok a následně protřepat po dobu několika sekund.
2. Inkubovat směs při 50 °C ve vodním inkubátoru po dobu 1 hodiny nebo ve vzduchovém inkubátoru po dobu minimálně 2 hodin.
3. Přenést 500 µl směsi do 1,5 ml mikrozkušavky.
4. Do mikrozkušavky přidat 20 µl roztoku Oragene Purifier (OG-L2P) a vortexovat po dobu několika sekund.
5. Inkubovat na ledu po dobu 10 minut.
6. Stočit pomocí centrifugy při pokojové teplotě po dobu 5 min při 13 000 otáčkách za minutu.
7. Opatrně přenést supernatant pipetou do čisté mikrozkušavky.
8. K 500 µl supernatantu přidat 500 µl (stejný objem) 95-100 % ethanolu o pokojové teplotě a následně směs ve zkumavce opatrně 10x převrátit.
9. Nechat stát po dobu 10 minut při pokojové teplotě, aby se DNA zcela vysrážela.
10. Stočit pomocí centrifugy při pokojové teplotě po dobu 2 min při 13 000 otáčkách za minutu.
11. Opatrně odebrat pipetou supernatant bez porušení DNA peletu.
12. Opatrně přidat 250 µl 70 % ethanolu, nechat stát při pokojové teplotě po dobu 1 min a následně kompletně odstranit ethanol (odsát a nechat odpařit).
13. Přidat 100 µl TE roztoku (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) nebo vody k rozpuštění DNA peletu a vortexovat po dobu nejméně 5 s.
14. Zajistit kompletní hydrataci DNA inkubací při pokojové teplotě a následným vortexováním nebo promícháváním pipetou.
15. Pro dlouhodobé skladování plně hydratované DNA je doporučeno uložit DNA v TE do alikvot do – 20 °C, případně do 4 °C pro skladování po dobu 1-2 měsíců.

**Příloha 4. Primery**

Primer		Sekvence (5' → 3')	Teplota hybridizace [°C]	Velikost produktu [bp]
A	<i>forward</i>	GAGGCCCTGTTTTGTTTGCATC	57,2	736
	<i>reverse</i>	AAACGGATGAGCTTGGAGCA	56,7	
B	<i>forward</i>	ACCACTGAACCACAGCTACC	57,1	714
	<i>reverse</i>	TCGGCTCTTACCTTCAGGCT	58,1	
C	<i>forward</i>	AGTCTCTTGTCTCCTTTTTCTGCT	55,3	403
	<i>reverse</i>	AGTGGAGAGACTTTCAATTGTGT	53,2	



#### **Příloha 5.** Postup amplifikace DNA

1. Do střední zkumavky přenést podle počtu vzorků příslušné množství vody a primerů (*forward* a *reverse*). Na jeden vzorek připadá 9,5  $\mu$ l vody a 0,5  $\mu$ l jednotlivých primerů.
2. Směs zvortexovat a stočit pomocí centrifugy.
3. Podle počtu vzorků přidat příslušné množství Go Taq Green Master Mixu složeného z Taq DNA polymerázy, reakčního pufru (pH 8,5), dNTPs, MgCl<sub>2</sub> a barviva používaného při elektroforéze. Na jeden vzorek připadá 12,5  $\mu$ l GoTaq Master Mixu.
4. Připravenou směs rozdělit pomocí pipety po 23  $\mu$ l do připravených mikrozkuvek umístěných na mrazícím stojanu.
5. Zvortexovat a stočit pomocí centrifugy předem vyizolované vzorky DNA.
6. Do každé z mikrozkuvek přidat 2  $\mu$ l templátové DNA z určitého vzorku a vytvořit tak celkový objem 25  $\mu$ l.
7. Umístit vzorky do termocycleru.

**Příloha 6.** Referenční sekvence NC\_000007.14 genu *TAS2R38*

5'-ATGTTGACTCTAACTCGCATCCGCACTGTGTCCTATGAAGTCAGGAGTACATTT  
CTGTTCAATTCAGTCCTGGAGTTTGCAGTGGGGTTTCTGACCAATGCCTTCGTTTTC  
TTGGTGAATTTTTGGGATGTAGTGAAGAGGCAGGCACTGAGCAACAGTGATTGTG  
TGCTGCTGTGTCTCAGCATCAGCCGGCTTTTCCTGCATGGACTGCTGTTCTGAGT  
GCTATCCAGCTTACCCACTTCCAGAAGTTGAGTGAACCACTGAACCACAGCTACC  
AAGCCATCATCATGCTATGGATGATTGCAAACCAAGCCAACCTCTGGCTTGCTGC  
CTGCCTCAGCCTGCTTTACTGCTCCAAGCTCATCCGTTTCTCTCACACCTTCCTGAT  
CTGCTTGGCAAGCTGGGTCTCCAGGAAGATCTCCAGATGCTCCTGGGTATTATTC  
TTTGCTCCTGCATCTGCACTGTCCTCTGTGTTTGGTGCTTTTTTAGCAGACCTCACT  
TCACAGTCACAACCTGTGCTATTCATGAATAACAATACAAGGCTCAACTGGCAGAT  
TAAAGATCTCAATTTATTTTATTCCTTTCTCTTCTGCTATCTGTGGTCTGTGCCTCCT  
TTCCTATTGTTTCTGGTTTCTTCTGGGATGCTGACTGTCTCCCTGGGAAGGCACATG  
AGGACAATGAAGGTCTATAACCAGAACTCTCGTGACCCAGCCTGGAGGCCACA  
TTAAAGCCCTCAAGTCTCTTGTCTCCTTTTTCTGCTTCTTTGTGATATCATCCTGTG  
CTGCCTTCATCTCTGTGCCCTACTGATTCTGTGGCGCGACAAAATAGGGGTGATG  
GTTTGTGTTGGGATAATGGCAGCTTGTCCCTCTGGGCATGCAGCCATCCTGATCTC  
AGGCAATGCCAAGTTGAGGAGAGCTGTGATGACCATTCTGCTCTGGGCTCAGAGC  
AGCCTGAAGGTAAGAGCCGACCACAAGGCAGATTCCCGGACACTGTGCTGA-3'

**Příloha 7.** Sekvence použité jako detektory migrantů v MFDM analýze

ENST00000547270: 886A>G

ENST00000547270: 145G>C, 416A>G, 886A>G

ENST00000547270: 785C>T, 822C>T

ENST00000547270: 439A>G, 785C>T

ENST00000547270: 145G>C, 569A>G, 886A>G

ENST00000547270: 145G>C, 464C>T, 886A>G

ENST00000547270: 785C>T, 833G>A

ENST00000547270: 703C>T, 785C>T

ENST00000547270: 549C>T, 785C>T

ENST00000547270: 42C>G, 785C>T

**Příloha 8.** Haplotypy genu *TAS2R38*

<b>Haplotyp</b>	<b>93</b>	<b>145</b>	<b>191</b>	<b>239</b>	<b>403</b>	<b>417</b>	<b>738</b>	<b>785</b>	<b>820</b>	<b>886</b>
H01	G	C	G	A	T	G	C	C	C	G
H02	G	G	G	A	T	G	C	T	C	A
H03	G	G	G	A	T	G	C	C	C	A
H04	G	G	G	A	T	G	C	C	C	G
H05	G	G	G	A	T	G	C	C	T	A
H06	G	C	G	A	T	G	C	C	C	A
H07	G	G	G	A	T	G	T	C	C	A
H08	G	G	G	A	T	G	C	T	C	G
H09	G	C	G	A	T	T	C	C	C	G
H10	G	G	G	G	T	G	C	C	C	G
H11	G	G	G	A	G	G	C	C	C	A
H12	A	G	G	A	T	G	C	C	C	A
H13	G	C	G	A	T	G	C	T	C	A
H14	G	G	A	A	T	G	C	T	C	A
H15	G	G	G	A	G	G	C	T	C	A
H16	G	C	G	A	T	G	C	T	C	G

(tučné = nesynonymní mutace, kurzíva = synonymní mutace)

**Příloha 9.** Zastoupení a frekvence haplotypů genu *TAS2R38* u mauritánských populací

Haplotyp	MOO		SNK		FMA		celkem	
	n	frekvence	n	frekvence	n	frekvence	n	frekvence
H01 (PAV)	35	0,380	37	0,378	45	0,489	117	0,415
H02 (AVI)	38	0,413	34	0,347	32	0,348	104	0,369
H03 (AAI)	7	0,076	11	0,112	12	0,130	30	0,106
H04 (AAV)	5	0,054	2	0,020	0	-	7	0,025
H05 (AAI)	1	0,011	2	0,020	0	-	3	0,011
H06 (PAI)	0	-	3	0,031	1	0,011	4	0,014
H07 (AAI)	0	-	1	0,010	1	0,011	2	0,007
H08 (AVV)	3	0,033	0	-	0	-	3	0,011
H09 (PAV)	2	0,022	0	-	0	-	2	0,007
H10 (AAV)	1	0,011	0	-	0	-	1	0,004
H11 (AAI)	0	-	4	0,041	0	-	4	0,014
H12 (AAI)	0	-	1	0,010	0	-	1	0,004
H13 (PVI)	0	-	1	0,010	0	-	1	0,004
H14 (AVI)	0	-	1	0,010	0	-	1	0,004
H15 (AVI)	0	-	1	0,010	0	-	1	0,004
H16 (PVV)	0	-	0	-	1	0,011	1	0,004
<b>celkem</b>	92		98		92		282	