Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: B-BI

Veronika Vosmíková

Variabilita amylázového genu u člověka
Amylase gene variability in human populations

Typ závěrečné práce:

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel:

prof. Mgr. Viktor Černý, Dr.

Praha, 2024

Charles University

Faculty of Science

Study programme: Biology

Branch of study: B-BI

Veronika Vosmíková

Amylase gene variability in human populations
Variabilita amylázového genu u člověka

Type of thesis:

Bachelor´s thesis

Supervisor:

prof. Mgr. Viktor Černý, Dr.

Prague, 2024

Poděkování: Děkuji prof. Mgr. Viktoru Černému, Dr. za odborné vedení práce, ochotu a vstřícnost při konzultacích.

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. 2024

Podpis: V. Vosmíková

ABSTRAKT: Amyláza je enzym produkovaný u člověka v pankreatu a slinných žlázách, jehož funkcí je štěpení škrobu. Geny pro slinný izoenzym (*AMY1*) nacházející se na chromozomu 1p21.1 vykazují výraznou variabilitu v počtu kopií (CNV). Jejich počet pozitivně koreluje s výsledným množstvím produkovaného enzymu. Tato variabilita je pravděpodobně důsledkem pozitivní selekce v lidské evoluční historii a odráží zastoupení škrobu v potravě jednotlivých populací. Škrob přednatrávený slinnou α-amylázou je vstřebáván efektivněji, s vyšším ziskem energie v pozdějších fázích jeho metabolizace. Vyšší produkce α-amylázy tak mohla být jedním z faktorů rapidního zvětšování mozku u člověka a mnohem později i přechodu k zemědělství. Řadila by se tím mezi další známé evoluční změny v lidském genomu podmíněné subsistencí, vedoucí např. k laktázové perzistenci či pomalejší acetylaci xenobiotik. V současnosti se počet kopií a množství produkované α-amylázy může odrážet především na hladině glukózy v krvi, produkci inzulínu po příjmu potravy a na incidenci některých civilizačních onemocnění, jakými jsou např. obezita či diabetes II. typu. Sporný je vliv slinné α-amylázy na složení mikrobiomu, kardiovaskulární onemocnění a prozánětlivý profil jedince. Pokračující výzkum by mohl osvětlit podmínky přispívající ke vzniku zmíněných patologií a poskytnout poznatky pro personalizaci diet v závislosti na stravovacích návycích původních lidských populací.

Klíčová slova: α-amyláza, CNV *AMY1*, evoluční genetika, škrob, obezita, diabetes

ABSTRACT: Amylase is a starch-digesting enzyme produced by the pancreas and salivary glands in humans. Genes for the salivary isoenzyme (*AMY1*), located on chromosome 1p21.1, show remarkable variability in their copy numbers (CNV). Their count is positively correlated with the final amount of the produced enzyme. This variability could be the result of positive selection during human evolution, depending on the amount of starch consumed by various populations. Starch pre-digested by salivary α-amylase is absorbed more effectively, resulting in a greater gain of energy in later stages of the metabolizing process. Thus, it could have been one of the factors for rapid brain growth in humans and, significantly later, even for the agricultural transition. It could belong to a group of other known subsistence-based evolutionary changes in the human genome, such as those resulting in lactase persistence or slow acetylation of xenobiotics. Nowadays, the number of copies and the amount of produced α-amylase can influence the glucose level in the blood and insulin production after consumption, as well as the incidence of certain civilization diseases, such as obesity or type II diabetes. The influence of salivary α-amylase on the composition of the microbiome, cardiovascular diseases, and the pro-inflammatory profile remains uncertain. Further research could shed light on the conditions that contribute to the pathologies mentioned above and provide information for creating personalized diets based on the dietary habits of ancestral human populations.

Key words: α-amylase, CNV *AMY1*, evolutionary genetics, starch, obesity, diabetes

Obsah

1 Úvod ... 1

2 Škrob a amyláza ... 2

2.1 Škrob a jeho role v lidské stravě ... 2

2.2 Amyláza ... 2

2.2.1 Amyláza ve slinách a její funkce ... 3

3 Geny pro amylázu ... 4

3.1 CNVs v genu pro amylázu ... 5

3.1.1 Asociace mezi CNV *AMY1* a *AMY2* ... 7

4 Evoluční vývoj genu *AMY1* ... 7

4.1 Vývoj počtu kopií *AMY1* a množství amylázy ve slinách napříč druhy ... 10

4.2 Selekce a její vliv na počet kopií *AMY1* u anatomicky moderního člověka ... 13

5 CNV *AMY1* v kontextu současných lidských populací ... 15

5.1 Konzumace škrobu v celosvětovém měřítku ... 15

5.2 Korelace mezi množstvím škrobu v potravě a CNV *AMY1* ... 16

5.3 Vlivy CNV *AMY1* na tělesné funkce, metabolismus ... 17

5.3.1 CNV *AMY1* a BMI, obezita ... 17

5.3.2 CNV AMY1 a inzulín, diabetes, glykemická odpověď ... 20

5.3.3 Vliv amylázy v souvislosti s mikrobiomem ... 22

5.3.4 Další možné vlivy počtu kopií *AMY1* na organismus ... 23

5.3.5 Shrnutí vlivu amylázy na metabolismus ... 24

6 Potravní adaptace v lidské evoluci ... 25

6.1 Přehled známých adaptací na změny stravovacích návyků v lidské evoluci ... 25

6.2 Chronologický přehled evolučních změn dle subsistence ... 27

7 Závěr ... 28

8 Použitá literatura ... 31

1 Úvod

Enzym α-amyláza, jehož funkcí je štěpení škrobu, nacházíme u mnoha zástupců živočišné říše. Obratlovci jej mohou produkovat ve dvou izoformách – pankreatické a slinné. Pankreatická forma se vyskytuje u všech obratlovců, k produkci slinné formy dochází u omezeného počtu druhů. V lidském genomu je slinná forma enzymu kódována několika kopiemi genu *AMY1*, jejichž počet vykazuje výraznou variabilitu. Množství kopií *AMY1* zároveň koreluje s výsledným množstvím produkovaného enzymu. Vzhledem k této korelaci a k odlišnému počtu kopií u lidských populací dle zastoupení škrobu ve stravě se zdá, že jde o výsledek pozitivní selekce. Vzhledem k výraznému navýšení konzumace škrobu po zemědělské tranzici by právě vyšší produkce α-amylázy mohla hrát významnou roli při zvyšování získané energie a podílet se na zefektivnění lidského metabolismu.

Geny *AMY1* (*AMY1A, AMY1B, AMY1C)* se u člověka nachází na chromozomu 1p21.1 v klastru s dalšími dvěma geny pro pankreatickou α-amylázu (*AMY2A*, *AMY2B*) a pseudogenem *AMYP1*. Všechny tyto geny pocházejí z jednoho ancestrálního genu, u něhož došlo ke dvěma po sobě jdoucím duplikacím s inzercí retrovirálního úseku v jedné z linií a následné triplikaci prekurzoru pro *AMY1* geny. Počáteční vývoj genu *AMY1* lze sledovat v linii primátů, nicméně předpokládá se, že k jeho duplikaci došlo nezávisle jak v linii člověka, tak u ostatních hominidů. Změnou stravovacích návyků a zvýšením konzumace škrobu u lidských populací poté došlo k navýšení počtu kopií genu *AMY1* od 1 do 27 diploidních kopií, nejspíše právě v důsledku potravní adaptace.

S touto variabilitou jsou pak spojené individuální odlišnosti v efektivitě trávení škrobu, což může v některých případech vést ke zvýšení či snížení rizika obezity, diabetu II. typu a, dle některých výzkumů, i metabolického syndromu či kardiovaskulárních onemocnění. Jiné výzkumy dále naznačují provázanost se změnami složení střevní či ústní mikroflóry.

Tato bakalářská práce si klade za cíl popsat strukturu lidských genů pro α-amylázu, jejich evoluční vývoj, a následně se zaměřit na původ a význam lidské variability u kopií genu *AMY1*. Podrobně zmapuje vývoj počtu kopií *AMY1* před oddělením linií neandertálců a anatomicky moderních lidí, přes výraznou změnu v lidské subsistenci, kterou bylo zavedení výroby potravin domestikací rostlin a zvířat. Shrne poznatky, na jejichž základě se zdá, že vývoj tohoto genu je dílem recentní pozitivní selekce. Uvede, jaké důsledky má vyšší či nižší počet kopií genu *AMY1* pro současné populace a některé patologické stavy současné společnosti. Následně bude vývoj tohoto genu zasazen do širšího kontextu selekčně podmíněných znaků v lidské evoluci, které primárně souvisí s potravními návyky.

2 Škrob a amyláza

2.1 Škrob a jeho role v lidské stravě

Škrob je glukózový polymer vyskytující se ve stabilních semikrystalických granulách. Je tvořen především amylózou a amylopektinem, přičemž procentuální zastoupení těchto polymerů se může lišit (Hardy et al., 2015). Stejně tak se liší obsah škrobu v jednotlivých potravinách. Mezi ty s vysokým obsahem patří např. rýže, brambory, obiloviny či luštěniny.

Škrob se řadí mezi stravitelné sacharidy – tedy ty, které je lidské tělo schopné zpracovat. V lidské stravě představují důležitý zdroj energie, neboť odpovídají za 40-75 % energetického příjmu. Právě škrob mezi nimi zaujímá prominentní postavení jakožto nejvíce zastoupený stravitelný sacharid (Hardy et al., 2015). Množství potravin s jeho vysokým obsahem ve stravě nicméně není u jednotlivých lidských populací homogenní. Populace se tak dají rozdělit na ty s vyšším (high-starch, HS) či nižším (low-starch, LS) příjmem škrobu. Mezi HS se řadí převážná většina současných populací po průmyslové revoluci. Malé množství škrobu je konzumováno u populací, jako jsou pastevecké komunity východosibiřských Jakutů či východoafrických Datogů (Perry et al., 2007).

2.2 Amyláza

Amyláza je široce zastoupený enzym štěpící škrob. Amyláza savců (*Mammalia*) nese označení α-amyláza (α-1,4-glukan-4-glukan-hydroláza) s kódovým enzymovým číslem EC 3.2.1.1. (Merritt et al., 1973). Jedná se o monomerický, vápník vážící protein (Santos et al., 2012), existující ve dvou formách s rozdílným orgánovým výskytem. V pankreatu dochází k produkci pankreatického izoenzymu a v ústní dutině je slinnými žlázami produkován izoenzym slinný (Merritt et al., 1973).

K expresi α-amylázy v pankreatu dochází u všech obratlovců, nicméně ve slinných žlázách je α-amyláza produkována pouze u několika druhů savců z řádů primátů (*Primates*), zajícovců (*Lagomorpha*), hlodavců (*Rodentia*) a letounů (*Chiroptera*) (Samuelson et al., 1996). Vždy se jedná o omnivorní, případně herbivorní živočichy, u savců s obligátní karnivorií není α-amyláza ve slinách produkována nikdy (*Boehlke et al., 2015).

Pro tento stav byly navrženy dva evoluční modely. Jeden tvrdí, že savčí předek exprimoval α-amylázu v pankreatu i ve slinách a druhá schopnost pak byla v několika liniích ztracena. Druhý (preferovaný) model naopak postuluje, že předek savců exprimoval α-amylázu jen v pankreatu a schopnost její exprese ve slinách byla nabyta několika řády savců druhotně a nezávisle na sobě. Tuto teorii podporuje například strukturální i sekvenční rozdílnost promotorů pro amylázu ve slinách u lidí a myší. Její součástí je také předpoklad pozitivní selekce ve prospěch produkce α-amylázy ve slinách v evoluci savců (Samuelson et al., 1996; Ting et al., 1992).

I vzhledem k druhové omezenosti produkce α-amylázy ve slinách je za hlavní enzym trávící škrob považována pankreatická α-amyláza. Rolí slinné α-amylázy je především iniciace trávicího procesu po aktivním promíchání enzymu s rozžvýkanou potravou (Mandel et al., 2010). Jejím působením dojde k uvolnění oligomerů a malého množství glukózy z polymerního škrobu (Santos et al., 2012). Jeho prvotní rozklad na oligo- a disacharidy umožňuje percepci menších sacharidových jednotek chuťovými receptory. Díky tomu dochází k signalizaci trávicímu systému, čímž se zefektivňuje následný průběh trávení (Peyrot des Gachons and Breslin, 2016). Přednatrávený škrob postupuje do tenkého střeva, kde je dále štěpen pankreatickou α-amylázou. Trávicí proces je dokončen enzymy (disacharidázami) kartáčového lemu tenkého střeva (Tucci et al., 2010).

2.2.1 Amyláza ve slinách a její funkce

Lidské sliny hrají poměrně důležitou roli v trávicím procesu. Zastávají při něm hned několik funkcí od solubilizace přijaté potravy, přes čištění ústní dutiny, formování první ochranné bariéry proti patogenům, podílu na vnímání chuti, po začátek trávení lipidů a škrobu (Pedersen et al., 2002).

Tyto funkce vycházejí z jednotlivých složek obsažených ve slinách. Hlavní z nich je voda (až 99 %), zbylou část tvoří více než 2000 druhů peptidů. Z tohoto počtu je 400 až 600 druhů peptidů produkováno slinnými žlázami (Amado et al., 2010). Právě do této skupiny se řadí i α-amyláza, jejíž výsledné množství se pohybuje mezi 40-50 % všech proteinů ve slinách (Mandel et al., 2010). K její produkci dochází po příslušné stimulaci, do které je zapojen jak sympatický, tak parasympatický systém (Santos et al., 2012). Její funkcí je, jak již bylo zmíněno, katalýza hydrolytické činnosti vnitřních α-1,4-glykosidických vazeb, čímž zprostředkovává trávení sacharidů - zejména škrobu (Santos et al., 2012).

Amylázový protein ve slinách může být glykosylován (zhruba čtvrtina) či bez glykosylace (zbylé tři čtvrtiny), každá z těchto forem pak vykazuje odlišnou stabilitu a aktivitu (*Bank et al., 1991; Yang et al., 2015b). Aktivita α-amylázy ve slinách je z velké části (byť ne úplně) inhibována v prostředí s nízkým pH, a její funkce tedy spočívá především v iniciaci trávení v ústní dutině. Může zde zasahovat také do bakteriálního složení či se dále podílet na regulaci homeostázi metabolické glukózy (Pajic et al., 2019). Existují názory, že by slinná α-amyláza mohla napomáhat trávení škrobu i po polknutí sousta v dalších částech trávicí soustavy, neboť inhibice nízkým pH není dokonalá (Santos et al., 2012). Pro jednoznačný závěr však zatím není dostatek dat. V malé míře byla pak produkce slinného izoenzymu detekována také v tukové tkáni. Zatím však není zcela jasné, jakou roli by měla zastávat zde (Falchi et al., 2014; Mejía-Benítez et al., 2015).

Celkové množství produkované α-amylázy a její aktivita jsou mezi populacemi i jednotlivci značně variabilní v závislosti na fyziologických, psychosociálních faktorech a také na prostředí. Je možné mít dva jedince se stejnou koncentrací α-amylázy ve slinách a rozdílnou aktivitou, kterou dané množství α-amylázy vykazuje a vice versa (Mandel et al., 2010). Do tohoto vztahu vstupují cirkadiální rytmy,

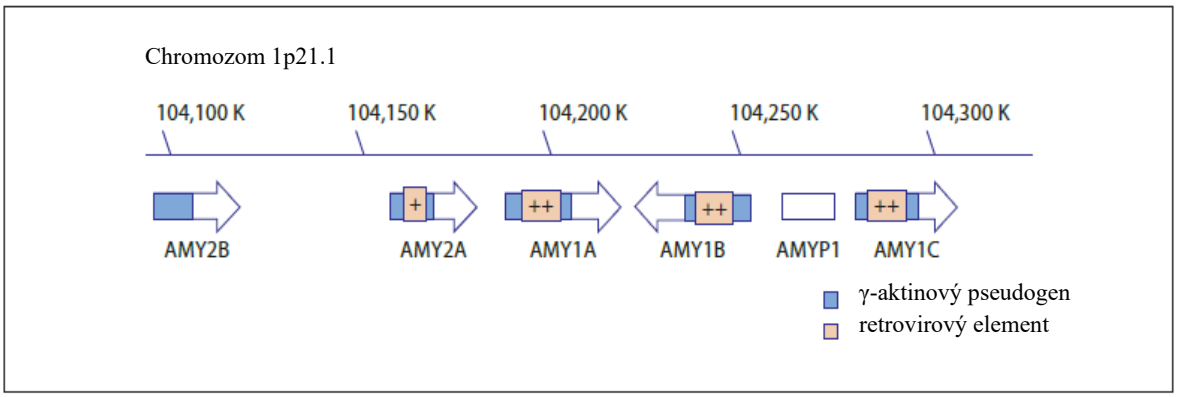
množství stresu (Mandel et al., 2010), míra hydratace, stravovací návyky a složení stravy – větší příjem sacharidů přispívá k vyšší aktivitě α-amylázy (Santos et al., 2012; Squires, 1953). Roli hraje také stupeň vývoje slinných žláz (Yang et al., 2015a) a míra exprese genu v různých stádiích ontogenetického vývoje, nicméně zde jsou odlišnosti (i v porovnání s pankreatickou α-amylázou) spíše menší. Exprese genů *AMY1* v organismu začíná zpravidla již od 12.-18. týdne těhotenství. Po zbytek života pak zůstává relativně konstantní (Laxova, 1972; Tye et al., 1976). Vzhledem k tomu, že sekreci α-amylázy ve slinách ovlivňuje adrenergní regulace a osa hypotalamus-hypofýza-nadledviny (HPA) (Granger et al., 2007), byl zkoumán také vliv tělesné aktivity. Některé studie uvádějí, že právě v reakci na cvičení se zvyšuje produkce tohoto proteinu (*Chatterton et al., 1996; *Kivlighan and Granger, 2006). Vliv kvality spánku na množství produkované amylázy nebyl jednoznačně potvrzen, byť některé studie udávají vliv méně kvalitního spánku na zvýšené množství α-amylázy ve slinách. U objektivně měřitelných faktorů (jako např. délka spánku) se však korelace neukázala (*Räikkönen et al., 2010; Van Lenten and Doane, 2016).

Geneticky se pak množství α-amylázy ve slinách odvíjí od počtu kopií genu *AMY1*, jednonukleotidových polymorfismů (SNPs) v nich a rozdílů v efektivitě transkripce a translace v kontextu rozdílných haplotypů (Heianza et al., 2017; Mandel et al., 2010).

3 Geny pro amylázu

Geny kódující α-amylázu se nacházejí v klastru o 230 kb na chromozomu 1p21.1 (Obrázek 1). U nejčastějšího lidského haplotypu se klastr skládá z pěti genů – genů *AMY1* (*AMY1A*, *AMY1B*, *AMY1C*), které kódují α-amylázu ve slinách, a genů *AMY2* (*AMY2A*, *AMY2B*), k jejichž expresi dochází v pankreatu. Všechny lidské geny pro α-amylázu obsahují γ-aktinový pseudogen, do kterého je u *AMY1* genů vložen endogenní retrovirový element (část elementu najdeme i v genu *AMY2A*, nicméně ne tak rozsáhlou). Dále se v klastru nachází ještě pseudogen *AMYP1* (Samuelson et al., 1996, 1990; Santos et al., 2012).

Sekvence tří genů *AMY1* jsou navzájem identické z 99,9 %, tato sekvence je pak z 93,2% identická se sekvencí genu *AMY2A* a z 93,6% s *AMY2B*. Mezi dvojicí genů *AMY2* je identita 94 % (Carpenter et al., 2015). Rozhraní intron/exon jsou u genů *AMY1* a *AMY2* velmi podobná, nicméně jejich promotory si nejsou příbuzné. Transkripce *AMY1* genů začíná uvnitř sekvence γ-aktinového pseudogenu a promotor je složen z pseudogenové a retrovirové sekvence (Samuelson et al., 1996).

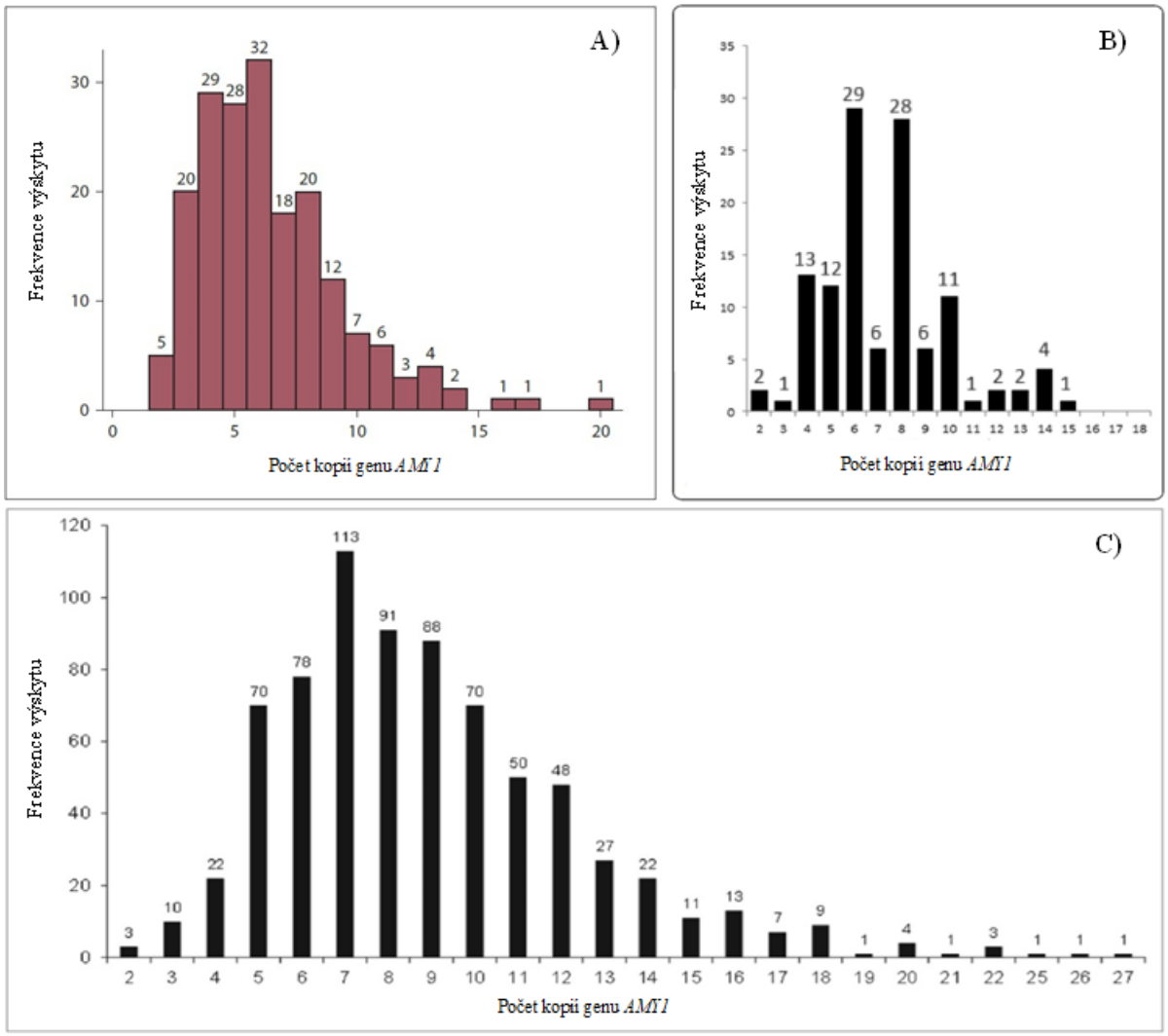


Obrázek 1. Klastr genů pro α-amylázu na chromozomu 1p21.1, který obsahuje 2 geny pro pankreatickou α-amylázu (AMY2B, AMY2A), 3 geny pro slinnou α-amylázu (AMY1A, AMY1B, AMY1C) a 1 pseudogen (AMYP1). Modře jsou značené sekvence γ-aktinového pseudogenu, retrovirální sekvence jsou vyznačené béžovou barvou a jejich množství udává počet znamének + (Santos et al., 2012) – upraveno.

3.1 CNVs v genu pro amylázu

Variace počtu kopií (Copy Number Variants – CNVs) je v obecné rovině termín používaný pro opakující se sekvence, jejichž počet se mezi jedinci stejného druhu liší. CNVs jsou tedy součástí celkové diverzity lidských populací a zároveň makro- i mikroevolučních procesů (Pös et al., 2021).

U moderního člověka jsou uváděny CNV u genu pro α-amylázu v rozmezí 1-15 diploidních kopií (Mandel and Breslin, 2012), 1-18 diploidních kopií (Yang et al., 2015b), 2-16 diploidních kopií (Perry et al., 2007; Santos et al., 2012; Tan et al., 2016), 2-20 diploidních kopií (Santos et al., 2012), 2-27 diploidních kopií (*Fernández and Wiley, 2017; Marcovecchio et al., 2016). Zdá se, že maximální počet kopií genu *AMY1* v těchto souborech souvisí s počtem jedinců. Čím je počet pozorování (počet jedinců v souboru) vyšší, tím vyšší je i pravděpodobnost záchytu jedince s vyšším počtem kopií. Rozložení CNV v několika vybraných populacích je uvedeno na Obrázek 2.

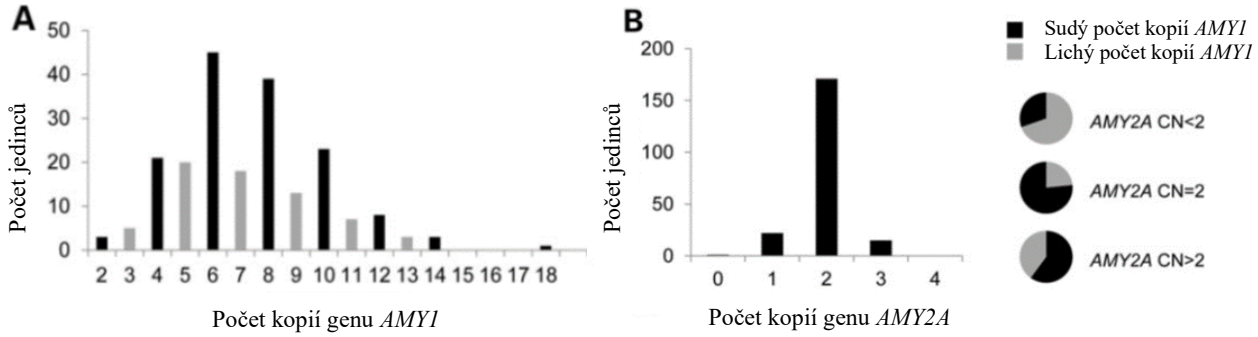


Obrázek 2. Počet diploidních kopií genu AMY1: A) V kohortě 189 jedinců z Chile, v rozmezí 2-20 diploidních kopií tohoto genu měl největší počet jedinců (32) 6 těchto kopií (Santos et al., 2012) - upraveno. B) V kohortě 118 jedinců z Velké Británie, kde je rozmezí počtu kopií AMY1 2-15, mělo nejvíce jedinců rovněž 6 kopií (Carpenter et al., 2017) - upraveno. C) U kohorty 744 italských jedinců byl v rozmezí 2-27 nejčastější počet kopií 7 (Marcovecchio et al., 2016) - upraveno.

Variabilita se liší u konkrétních genů klastru. Pseudogen *AMY1P* a geny pro α-amylázu ve slinách *AMY1A* a *AMY1B* vykazují výrazně větší variabilitu než geny pankreatické α-amylázy *AMY2A* a *AMY2B* (Santos et al., 2012). To vypovídá o působení rozdílných selekčních tlaků na produkci enzymů, které tyto geny kódují, a poukazuje na důležitou roli, kterou α-amyláza ve slinách zastává (Mandel and Breslin, 2012). Toto však nejspíš neplatí pro třetí z α-amylázových genů exprimovaných v ústní dutině (*AMY1C*), u něhož je počet kopií převážně invariantní (Santos et al., 2012).

3.1.1 Asociace mezi CNV *AMY1* a *AMY2*

Většina chromozomů člověka má jednu kopii genů *AMY2A* a *AMY2B* a variabilní počet kopií *AMY1*. Je zajímavé, že sudý počet kopií genu *AMY1* výrazně převažuje nad lichým (Rukh et al., 2017; Usher et al., 2015). Navíc je u populací zřetelná korelace mezi množstvím kopií *AMY1* a *AMY2A* (Carpenter et al., 2015), jejich počty si odpovídají sudostí/lichostí (Obrázek 3) (Usher et al., 2015). U menšinové části populací se objevuje lichý počet kopií *AMY1*, který je asociován s delecí či duplikací genů *AMY2*. Delece *AMY2A* genu se zdají časté u jedinců současných evropských a euroamerických populací (Carpenter et al., 2015), největší frekvence delecí genu *AMY2A* se ukazuje u populací severovýchodní Sibiře. Tato delece je asociována s nízkým počtem kopií *AMY1* (Inchley et al., 2016). Největší míru duplikací genů *AMY2A*/*AMY2B* vykazují dle dostupných výzkumů Afričané. U populací jižní Asie se vyskytuje jen málo variací v počtu kopií *AMY2* a téměř všichni zkoumaní jedinci mají sudý počet kopií *AMY1* (Carpenter et al., 2015).



Obrázek 3. A) výskyt sudého a lichého počtu kopií pro 209 jedinců euroasijského původu; B) znázornění korelace mezi sudým a lichým počtem kopií genů AMY1 dle počtu kopií genu AMY2A u stejné skupiny jedinců (Carpenter et al., 2015) – upraveno.

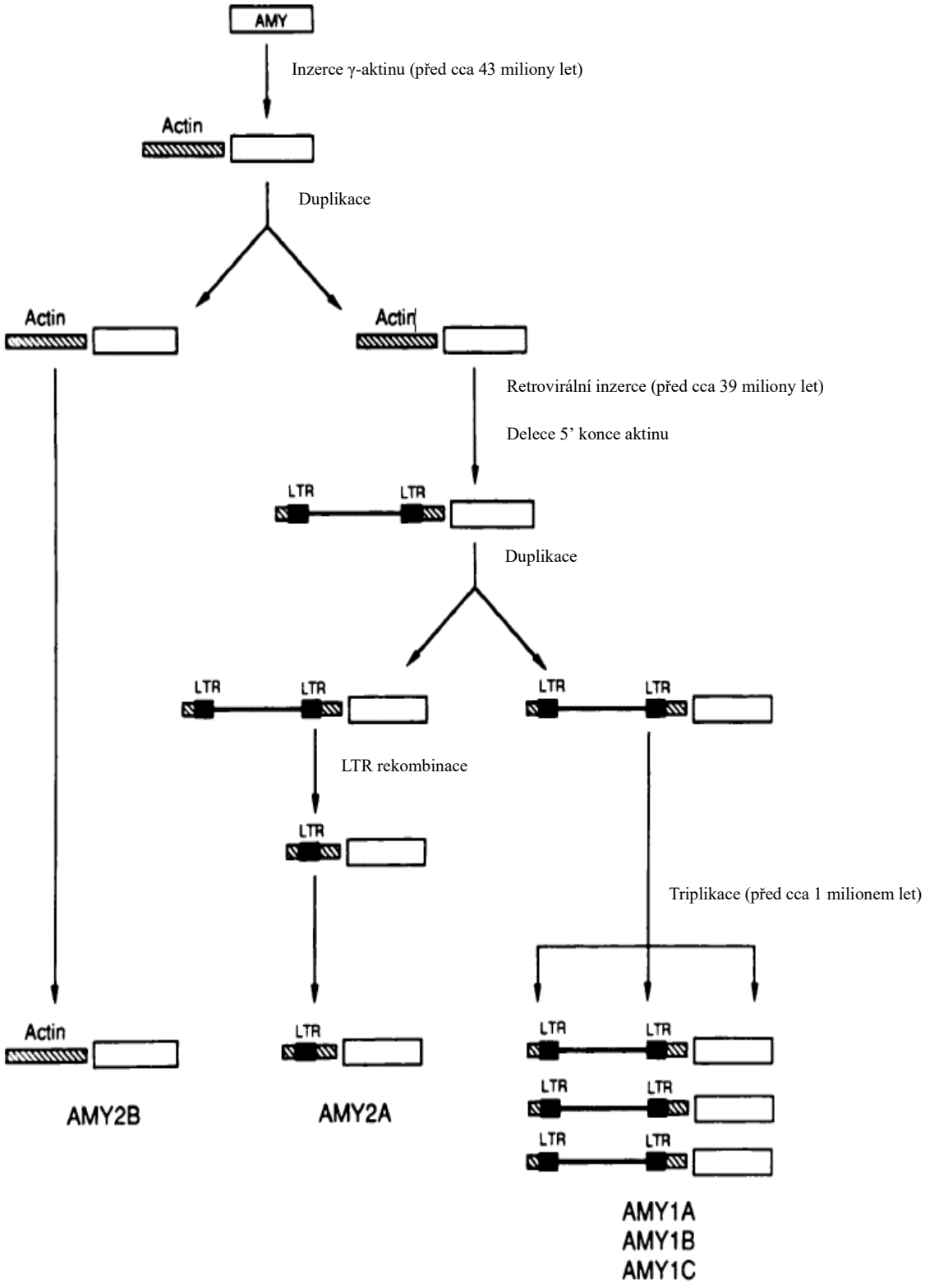
4 Evoluční vývoj genu *AMY1*

Cesta vzniku a vývoje genu *AMY1* napříč druhy a jeho zmnožení je zmapována způsobem viditelným na Obrázek 4. Původ tohoto genu je odvozen od prekurzoru genu pro pankreatickou α-amylázu, u kterého došlo upstream od prvního kódujícího exonu k inzerci γ-aktin pseudogenu. Tato událost bývá datována do časového úseku před minimálně 43 miliony let (Hardy et al., 2015; Pajic et al., 2019; Samuelson et al., 1996, 1990). Spadá tak do období po oddělení ploskonosých opic (opic Nového světa, *Platyrrhini*) od ancestrálního stromu primátů. U ploskonosých opic tedy γ-aktin pseudogenovou sekvenci u promotoru nenajdeme (Samuelson et al., 1996). Inzerci pseudogenu následovala duplikace původního genu na prekursor genů *AMY2A* a *AMY1* a prekursor pro gen *AMY2B*. Od té chvíle dochází k jejich nezávislému vývoji (Samuelson et al., 1990).

U prekursoru genů *AMY2A* a *AMY1* v místě γ-aktin pseudogenu došlo upstream k retrovirální inzerci a deleci 5' konce v γ-aktin pseudogenu. Teprve poté vznikly samotné geny *AMY2A* a *AMY1*. Toto se odehrálo až po oddělení úzkonosých opic (opic Starého světa, *Catarrhini*), a γ-aktin pseudogen

přerušený retrovirovou sekvencí tedy nacházíme pouze u hominidů (Samuelson et al., 1996; Santos et al., 2012). Prekursor *AMY1* byl následně triplikován a dal vznik genům *AMY1A*, *AMY1B* a *AMY1C*. Tuto událost lze datovat do doby po oddělení linie lidí a šimpanzů, ke kterému došlo před 5 až 7 miliony let (Samuelson et al., 1990). S ohledem na podobnost sekvence těchto genů, které jsou identické až z 99,9% (Carpenter et al., 2015), některé publikace řadí původ této triplikace do období mladšího než 1 milion let. Podobnost sekvencí však může být také dílem pozitivní selekce, a proto se na tento odhad nelze jednoznačně spoléhat (Hardy et al., 2015).

Panoval předpoklad, že právě vložená retrovirální sekvence odpovídá za tkáňově specifickou expresi α-amylázy ve slinných žlázách (Ting et al., 1992). Předpokládalo se, že jejím vložením byl aktivován kryptický promotor uvnitř γ-aktin pseudogenu. Částečná excize retrovirální sekvence u *AMY2A* by poté vrátila expresi tohoto genu do pankreatu (Hardy et al., 2015; Samuelson et al., 1990). Známe nicméně případ opic Starého světa, u kterých nedošlo k inzerci retroviru, zároveň však určité druhy (jak bude podrobněji diskutováno v další kapitole) amylázu ve slinách exprimují. Tento rozpor hypotézu o retrovirální sekvenci určující specifitu spíše vyvrací (Samuelson et al., 1996).



Obrázek 4. Schéma vzniku jednotlivých genů pro α-amylázu s odhadovanou datací jednotlivých událostí. Ze společného prekurzoru nejprve vzniká gen AMY2B a společný prekurzor pro geny AMY2A a AMY1. U něj dochází k retrovirální inzerci a částečné deleci v γ-aktin pseudogenu, následně projde duplikací a vytvoří samostatné linie AMY2A a AMY1, která následně projde triplikací za vzniku genů pro α-amylázu ve slinách AMY1A, AMY1B, AMY1C (Samuelson et al., 1990) - upraveno.

4.1 Vývoj počtu kopií *AMY1* a množství amylázy ve slinách napříč druhy

Zkoumáním amylázy u primátů (*Primates*) se na základě studií lemuřího genomu z podřádu poloopic (*Strepsirhini*) a předchozích zkoumání genomu předků infrařádu opic (*Simiiformes*) ukazuje, že předek primátů měl pravděpodobně jedinou haploidní kopii amylázového genu. Do tohoto infrařádu patřící ploskonosé opice v běžné stravě škrob nekonzumují, amylázu ve slinách neprodukují (případně jen v minimálním, nekvantifikovatelném množství) a genom většiny z nich obsahuje dvě haploidní kopie *AMY1*. Výjimkou je podčeleď malp (*Cebinae*), která má vyšší zastoupení škrobu v potravě než ostatní opice Nového světa, a u níž se objevuje zmnožení na 3 až 4 kopie (Pajic et al., 2019).

U infrařádu úzkonosých opic je situace ještě různorodější. Druhy opic Starého světa, které se živí listy (guerézy – *Colobus*, langurové – *Rhinopithecus* a kahauové – *Nasalis*), mají pouze jednu kopii genu, což naznačuje ztrátu v této linii. Několik druhů (např. makak rhesus – *Macaca mulatta*, druhy paviánů – *Papio)* exprimuje α-amylázu ve slinách v relativně velkém množství (a to i při porovnání s člověkem). K expresi zde dochází i přesto, že se v jejich genomu nevyskytují duplikace dosahující hodnot velkých primátů (Pajic et al., 2019; Perry et al., 2007). Při vzájemném porovnání některých rodů z čeledi hominidů (*Hominidae*) se ukazuje určitá variabilita v počtu kopií *AMY1* i množství α-amylázy ve slinách, nicméně tato variabilita nedosahuje té u člověka (Behringer et al., 2013).

Z některých dostupných dat vyplývá, že rod gorila (*Gorilla*) převyšuje počtem kopií *AMY1* rod šimpanz (*Pan*) (Wilson et al., 2006). Jiná data však udávají u goril a šimpanzů shodný počet dvou kopií *AMY1* (Pajic et al., 2019). Uvnitř šimpanzů je situace ještě méně zřejmá. Nejprve se zdálo, že šimpanz bonobo (*Pan paniscus*) pravděpodobně netvoří α-amylázu ve slinách vůbec (Perry et al., 2007). Toto tvrzení bylo podpořeno faktem, že je kódující sekvence genů *AMY1* u šimpanze bonobo narušena. Nicméně pozdější data ukázala, že bonobo produkuje množství amylázy ve slinách srovnatelné s ostatními druhy velkých primátů (tedy gorilami, orangutany a šimpanzi učenlivými) (Santos et al., 2012). Data u šimpanze učenlivého (*Pan troglodytes*) ukazují, že amylázu ve slinách tvoří v šestkrát až osmkrát menším množství než člověk (*Homo*) (Perry et al., 2007). Aktivita amylázy je u obou druhů šimpanzů menší než u gorily a orangutana (*Pongo*) (Behringer et al., 2013).

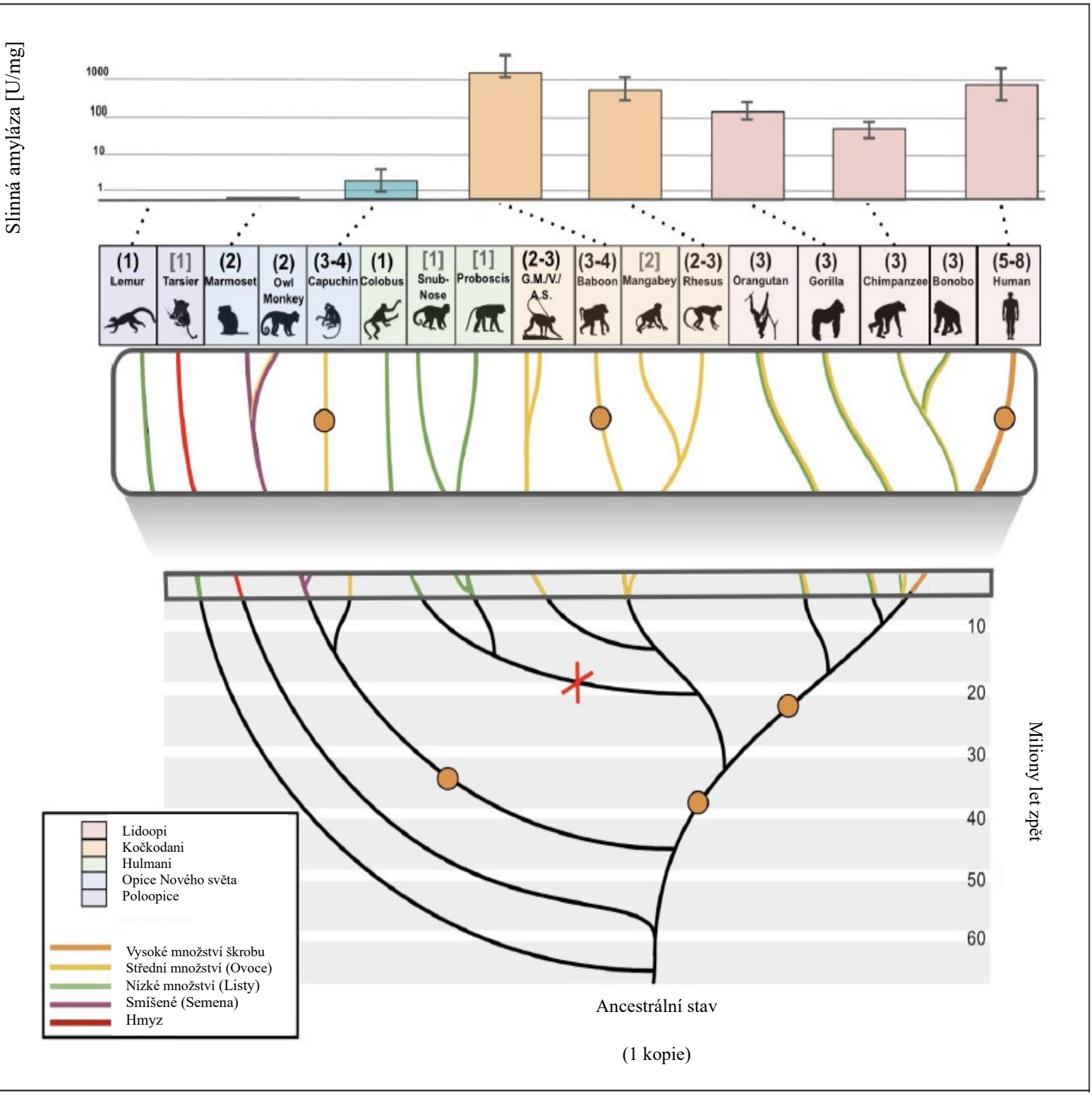
Co se týče genu *AMY1*, toho má současný člověk (*Homo sapiens sapiens*) průměrně asi třikrát více kopií (tedy 6) než šimpanz učenlivý, který má diploidní kopie 2 (Perry et al., 2015; Santos et al., 2012). Při porovnání sekvencí genů pro α-amylázu šimpanze bonobo a člověka dochází k alignmentu jednoho ancestrálního segmentu, zatímco zbylé kopie si neodpovídají. To, společně s výskytem rozdílných aminokyselin v produkovaném proteinu na pozici 19 (u člověka serin, u šimpanze prolin), poukazuje na nezávislou duplikaci genu *AMY1* u těchto linií z jediného společného genu (Yilmaz et al., 2023). Zároveň tato srovnání napovídají, že evoluční vývoj genu pro α-amylázu ve slinách probíhal spíše cestou zmnožení kopií u člověka než jejich ztrátou u šimpanze. To podporuje teorii pozitivní

selekce počtu kopií genu *AMY1* u populací druhů konzumujících větší množství škrobu (Obrázek 5), neboť strava šimpanzů je v porovnání se stravou člověka na škrob mnohem chudší (Perry et al., 2007).

Počáteční duplikace genu *AMY1* specifická pro člověka (*Homo*) pravděpodobně spadala do období před 6 miliony let (Samuelson et al., 1990) či 700 000 lety (Yilmaz et al., 2023) – velmi pravděpodobně tedy předcházela samotný vznik linie anatomicky moderních lidí (Perry et al., 2015; Yilmaz et al., 2023). V popisu dalšího vývoje se však studie rozcházejí. Dle některých byl počet diploidních kopií genu *AMY1* u linií příbuzných modernímu člověku stanoven na 2. Pro neandertálce (*Homo neanderthalensis*) se konkrétně jedná o 1,83 diploidní kopie, u denisovců o 1,76 diploidní kopie.

Ze shodné nukleotidové skladby původních referenčních sekvencí jednotlivých kopií genu autoři datují původ druhého zmnožení *AMY1* do období před 200 000 lety (Perry et al., 2015). Toto tvrzení je ve shodě s další studií, která druhou duplikaci *AMY1* datuje do období po oddělení linie anatomicky moderních lidí od neandertálců i v důsledku oddělení stravovacích návyků těchto dvou populací (Inchley et al., 2016). Dle výsledků pozdější studie se však již u neandertálců mohly vyskytovat 3 kopie genu (Yilmaz et al., 2023), což je počet, jaký má referenční genom moderních lidí (Perry et al., 2007).

Nejpravděpodobnějším mechanismem druhého i třetího zmnožení genu pro *AMY1* u člověka se zdá být duplikace nealelickou homologní rekombinací, která by mohla vysvětlovat převažující sudé číslo kopií *AMY1* v genomu (Yilmaz et al., 2023). Současná variabilita v počtu kopií u lidského genu *AMY1* je pravděpodobně výsledkem pozdějšího působení rozdílných selekčních tlaků u různých populací. Jejich intenzita závisela na složení potravy jednotlivých lidských populací a obsahu škrobu v ní (Perry et al., 2007).



Obrázek 5. Vývoj počtu genů pro α-amylázu v řádu primátů. Fylogenetické větvení znázorňuje oddělení jednotlivých linií s časovou specifikací na pravé straně diagramu. Oranžové tečky značí místa předpokládané genové duplikace, červený křížek pak označuje pravděpodobnou ztrátu genu v linii opic Starého světa. Horní větvení fylogenetického stromu je vyznačeno barvami dle převažující stravy pro daný rod primátů. Oranžová označuje stravu s vysokým obsahem škrobu, žlutá střední hodnotu a zelená malé zastoupení škrobu ve stravě. Čísla v závorkách uvádí celkový předpokládaný počet genů pro amylázu – černá v kulatých závorkách byla získaná pomocí techniky ddPCR, šedá v hranatých závorkách byla stanovena na základě referenčních genomů. U některých rodů je ve vrchní části diagramu uvedeno množství produkované α-amylázy ve slinách (Pajic et al., 2019) - upraveno.

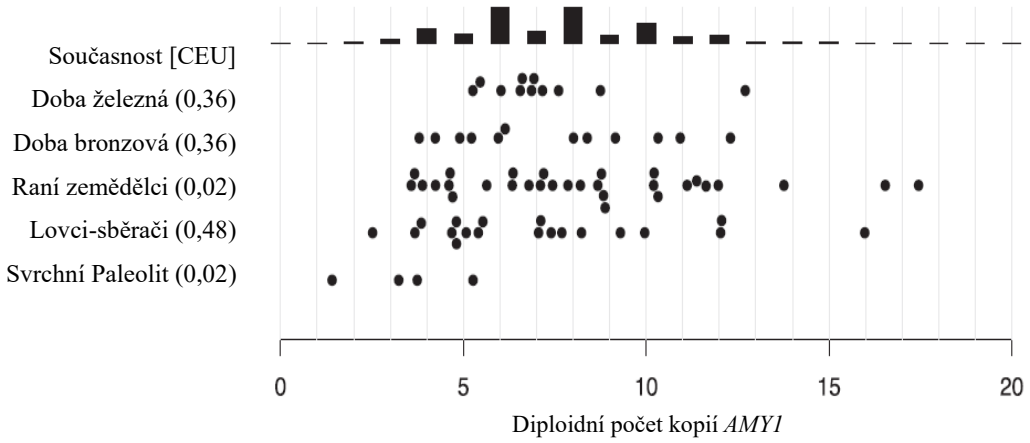
4.2 Selekce a její vliv na počet kopií *AMY1* u anatomicky moderního člověka

Zdá se, že CNV *AMY1* u člověka pozitivně koreluje s finálním vytvořeným množstvím α-amylázy ve slinách. Z dostupných dat současných populací, která v tomto kontextu prezentoval George H. Perry (2007), vyplývá, že populace, jejichž strava obsahuje větší množství škrobu, mají v průměru více kopií *AMY1* než populace s nízkým příjmem škrobu (Mandel et al., 2010; Mandel and Breslin, 2012; Perry et al., 2007; Santos et al., 2012). Byla tedy formulována teorie působení pozitivní selekce vedoucí ke zmnožení genu *AMY1* u zemědělců a lovců sběračů v suchých oblastech, kde je konzumace škrobu vyšší. V důsledku toho by se také zvýšila produkce α-amylázy ve slinách, což by umožnilo efektivnější trávení škrobu a v minulosti poskytovalo v těchto podmínkách evoluční výhodu. Naproti tomu u populací konzumujících nižší množství škrobu, kam spadají lovci sběrači z cirkum-arktické oblasti a z oblasti deštných lesů, případně také někteří pastevci, by docházelo k neutrální evoluci pod vlivem genetického driftu (Perry et al., 2007).

Na molekulární úrovni by teorii o působení pozitivní selekce odpovídala nezvykle nízká diverzita v genových úsecích přiléhajících k amylázovému lokusu (Inchley et al., 2016). Není však jisté, do jakého období můžeme začátek jejího působení a zmnožení genu *AMY1* datovat. Některé studie předpokládají, že již skupina lidí migrujících z Afriky, která založila eurasijskou populaci před cca 60 tis. lety (tzv. *out-of-Africa*), disponovala vyšším množstvím kopií než dvěma (Inchley et al., 2016; Yilmaz et al., 2023).

Analýza aDNA (= ancient DNA) nenachází rozdíl mezi variacemi počtu opakování pro gen *AMY1* mezi dnešními Evropany a těmi z doby železné, bronzové, ani z mezolitu a neolitu. Mezolitičtí lovci-sběrači dle této studie disponovali průměrným počtem kopií 7,2, který není statisticky odlišný od moderních Evropanů. Neolitičtí zemědělci měli průměrně 8,4 kopie. Jedinci ze svrchního paleolitu měli počet kopií nižší, konkrétně 3,4 (Mathieson and Mathieson, 2018). Studie zaměřující se na analýzu aDNA z Německa, Lucemburska a Švédska udává počet kopií *AMY1* u raných zemědělců na 16. Zkoumané genomy lovců-sběračů vykazují hodnoty mezi 6 až 12 kopiemi (Lazaridis et al., 2014).

Množství kopií *AMY1* by tedy bylo u populací před vznikem zemědělství srovnatelné s počtem kopií u dnešních lidí (Obrázek 6) (Mathieson and Mathieson, 2018). Data získaná z DNA mezolitických lovců-sběračů z území Lucemburska ukazují 13 kopií *AMY1*, což odpovídá dokonce vyšší hranici počtu kopií moderních lidí (Inchley et al., 2016). Z těchto dat není možné jednotlivá zmnožení kopií přesně datovat, nicméně docházíme k závěru, že k němu muselo dojít ještě před vznikem zemědělství (Mathieson and Mathieson, 2018).



Obrázek 6. Graf porovnávající počet diploidních kopií AMY1 u lidských populací od svrchního paleolitu až do současnosti. Data současných populací pochází od jedinců severoevropského původu (= CEU) (Usher et al., 2015). Údaje v závorkách uvádějí p-hodnoty t-testu udávající statistické rozdíly počtů kopií pro populaci CEU a původní populace. Dle těchto dat docházelo ke zvyšování počtu kopií genu již před vznikem zemědělství (Mathieson and Mathieson, 2018) – upraveno.

Tyto poznatky nejsou samy o sobě v přímém rozporu s pozdější selekcí navázanou na stravovací návyky, jak bylo uvedeno v původní studii (Perry et al., 2007). Z výzkumu změn ústní mikrobioty vychází, že škrob začíná hrát ve stravě rodu *Homo* důležitou roli již před 600 tisíci lety, což by předcházelo divergenci neandertálců a moderních lidí (Fellows Yates et al., 2021). Mohl být konzumován i lovci-sběrači ve formě zásobních podzemních orgánů rostlin (cibulí či hlíz), které jsou na tento polymer poměrně bohaté (Luca et al., 2010).

U balkánských populací moderních lidí se pak objevují také doklady o sběru a konzumaci některý druhů divokých obilovin. Zdá se tedy, že škrob byl přirozenou, byť ne tak hojnou, složkou potravy ještě před vznikem zemědělství. To pravděpodobně vedlo k vytvoření základních adaptací na jeho konzumaci, včetně zmnožení genu pro α-amylázu ve slinách, a následně usnadnilo přechod k výrobě potravin, především škrobu (Cristiani et al., 2021).

Důvodů, které by za pozitivní selekcí mohly stát, a výhod, které by vyšší počet kopií *AMY1* a vyšší produkce α-amylázy v ústech mohly přinášet, bylo navrženo hned několik. Bývá zdůrazňována důležitost stravitelných sacharidů pro plnění zvyšujících se metabolických požadavků zvětšujícího se mozku. Právě vařený škrob, jakožto zdroj glukózy, pomáhá zásobovat tkáně s vysokou glukózovou spotřebou – mozek, červené krvinky nebo vyvíjející se plod. Efektivita α-amylázy ve slinách je větší při trávení tepelně upraveného škrobu. Proto by pozitivní selekce pro vyšší tvorbu α-amylázy v ústech mohla následovat rozšíření tepelné úpravy jídla u předků anatomicky moderních lidí (Hardy et al., 2015; Inchley et al., 2016). Koevoluce tepelné úpravy a zvyšujícího se počtu kopií *AMY1* mohla umožnit rychlejší zvětšování mozku, ke kterému docházelo od středního pleistocénu (před 2 miliony až 500 000 lety). Zařazení většího množství škrobu do jídelníčku všežravých homininů jim tedy mohlo poskytnout evoluční výhodu pro další vývoj (Hardy et al., 2015). Dále schopnost kompletního a efektivního strávení

konzumovaného škrobu může zamezovat růstu patogenů, které by mohly nestrávený škrob využít. Tímto způsobem by mohly vyšší počet kopií *AMY1* a vyšší aktivita amylázy přispívat nejen k výživě, ale i k lepšímu zdravotnímu stavu populace (Pruimboom et al., 2014).

Nicméně výsledky analýzy molekulárního rozptylu mezi skupinami jihovýchodní Asie a severovýchodní Sibiře rozporují tvrzení o recentní pozitivní selekci působící na *AMY1*. Navíc porovnání počtu kopií genu současných populací a vzorků aDNA ukazují v této studii naopak spíše klesající trend a možnost sekundární ztráty variability některých populací (Inchley et al., 2016). Tato studie se však, byť rozšiřuje databázi studovaných sekvencí DNA na celosvětové měřítko, obecně vztahuje k větším skupinám a územním celkům a nikoli k jednotlivým populacím. Svými závěry původní teorii pozitivní selekce nepopírá, ale nepovažuje ji za zcela odpovídající. Ve své interpretaci prvotního působení pozitivní selekce a následné sekundární ztráty variability u některých populací je spíše osamocená. Vědecká obec se tedy většinově přiklání k interpretaci původní Perryho studie hovořící o čistě pozitivní selekci působící na zmnožování počtu kopií genu pro α-amylázu.

5 CNV *AMY1* v kontextu současných lidských populací

5.1 Konzumace škrobu v celosvětovém měřítku

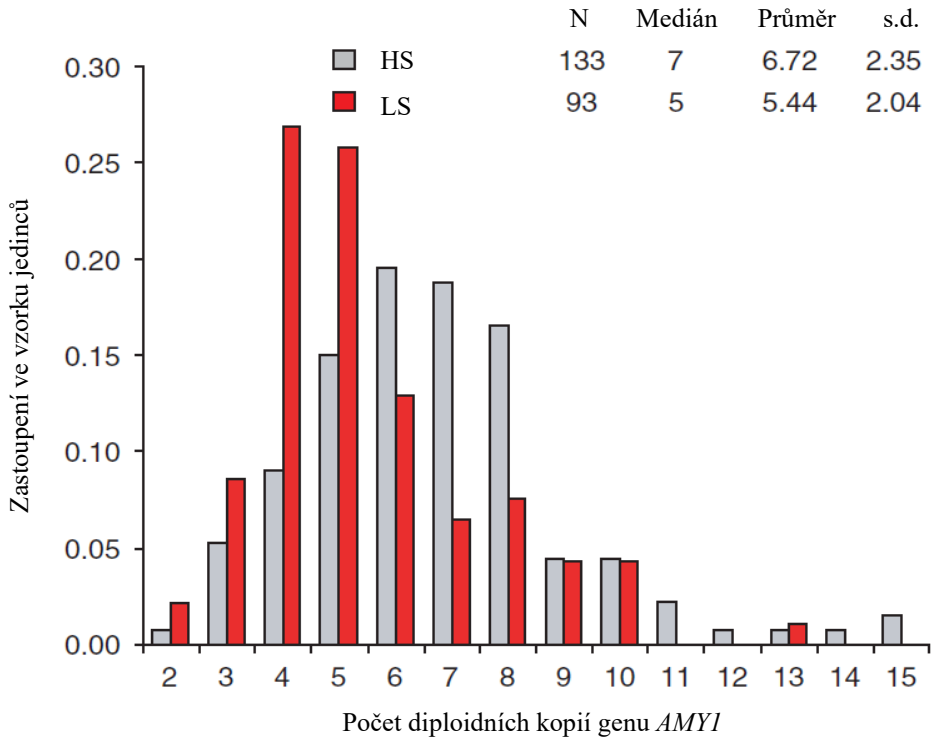
Škrob je významným komponentem stravy moderního člověka, i když se jeho konkrétní obsah v potravě současných populací liší. Obecně lze dnes populace rozdělit na ty s celkově vyšším příjmem škrobu (high-starch, HS) a nižším příjmem škrobu (low-starch, LS) (Perry et al., 2007).

Nízký příjem škrobu mají populace lovců-sběračů, jako jsou středoafričtí pygmejové Biaka (či pouze Aka) a Mbuti. Dále sem spadají také pastevecké komunity Datogů z Tanzanie a Jakutů obývajících část Sibiře. Jejich strava je z větší části založena na mase jako zdroji bílkovin a jednoduchých sacharidech z ovoce, mléka či medu (Perry et al., 2007). Naopak mezi populace s výrazným zastoupením škrobu v potravě se řadí především obyvatelstvo asijských zemí jako je Čína, Korea či Japonsko, kde je jeho majoritním zdrojem rýže. V Evropě se škrob konzumuje především ve formě pšenice a brambor. Stejně je tomu v Severní Americe v Kanadě a USA, kde u euroamerické populace zodpovídá škrob za cca 25 % energetického příjmu. Mexická populace také konzumuje velké množství škrobu – především ve formě kukuřice (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004; Perry et al., 2007). Z afrických populací, které byly studovány, mají vyšší příjem škrobu např. příslušníci kmene Hadzů ze severu Tanzanie. Jeho hlavním zdrojem jsou zde kořínky a hlízy (Perry et al., 2007).

5.2 Korelace mezi množstvím škrobu v potravě a CNV *AMY1*

Jak již bylo zmíněno, z četných studií vyplývá pozitivní korelace mezi počtem kopií *AMY1* a množstvím škrobu v potravě. U high-starch populací Euroameričanů, Japonců a Hadzů se objevuje průměrně 7 diploidních kopií *AMY1* (6,72 ± 2,35, s rozpětím 2-15 kopií) (Perry et al., 2007). U čínské populace se uvádí průměrně 8 diploidních kopií (8,21 ± 3,15, rozmezí 1-15 kopií) (Yang et al., 2015b). U korejské populace bylo rozpětí počtu kopií mezi 2 a 19, s nejčastějšími hodnotami v rozmezí 4-10 (Choi et al., 2015). V populaci mexických dětí bylo zaznamenáno množství diploidních kopií mezi 1-16 s nejčastější hodnotou 6 kopií (Mejía-Benítez et al., 2015). U low-starch populací (Biaka, Mbuti, Datoga, Jakuti) se dostáváme k průměrnému počtu 5 diploidních kopií (5,44 ± 2,04, rozmezí 2-13 kopií) (Perry et al., 2007).

Při porovnání high-starch populací Euroameričanů, Japonců a Hadzů (6,72 ± 2,35 diploidních kopií *AMY1*) a čtyř low-starch populací Biaka, Mbuti, Datogů a Jakutů (5,44 ± 2,04 diploidních kopií *AMY1*), je průměrný rozdíl počtů kopií *AMY1* o 1,28 diploidní kopie ve prospěch populací konzumujících škrob ve větším množství (Obrázek 7). Dále počet jedinců s 6 a více diploidními kopiemi, je mezi HS populacemi téměř dvakrát větší (70 % vs. 37 %) (Perry et al., 2007). Právě toto porovnání genomů současných lidských populací a konzistentnost výsledných rozdílů v počtu kopií mezi HS a LS populacemi je výrazným argumentem pro model pozitivní selekce působící na amylázový



lokus.

Obrázek 7. Porovnání počtu diploidních kopií genu AMY1 u populací s nízkým (červeně) a vysokým (šedě) příjmem škrobu v potravě (Perry et al., 2007) - upraveno.

5.3 Vlivy CNV *AMY1* na tělesné funkce, metabolismus

Po příjmu potravy dochází v organismu ke zvýšení hladiny krevního cukru (glukózy). Ta je vyšší v případě, že je potrava nejprve rozžvýkána a smíchána se slinami, než když dojde k polknutí celého sousta (Tan et al., 2016). V případě, že je tedy škrob, jakožto stravitelný/glykemický sacharid, přednatráven v ústech slinnou α-amylázou, zvýší se jeho strávená část a tím i množství absorbované glukózy oproti případu, kdy by byl škrob rovnou transportován do tenkého střeva, kde dochází k jeho vstřebávání (Mandel et al., 2010; Santos et al., 2012).

Hladina glukózy v plazmě je pak jedním z faktorů ovlivňujících sekreci inzulínu β-buňkami pankreatu. Inzulín má v těle mnoho funkcí souvisejících s metabolismem glukózy, tuků a udržováním homeostázi – od aktivace syntézy glykogenu a inhibice glukoneogeneze v játrech, přes potlačení sekrece glukagonu α-buňkami pankreatu, po inhibici odbourávání tuku či zvýšení glukózového transportu a podporu adipogeneze v bílé tukové tkáni. Jeho nedostatečná produkce tedy pro organismus znamená problémy s využitím energie z přijaté potravy (Park et al., 2021) a posprandiální hyperglykémie bývá spojována s chronickými onemocněními, např. diabetes mellitus II. typu (Jakubowicz et al., 2021). Efektivita trávení škrobu pak může mít vliv na obezitu, případně na riziko vzniku metabolického syndromu. Dále může ovlivňovat také složení střevního mikrobiomu, neboť nestrávený škrob může zvýhodňovat a poskytovat substrát pro jiné druhy bakterií (Poole et al., 2019).

Jednotlivé aspekty a mechanismy vlivu počtu kopií *AMY1* byly proto studovány v různých populacích, v mnoha případech však s protichůdnými výsledky. Výzkum v této oblasti ještě zdaleka není uzavřen a konkrétní role α-amylázy v návaznosti na některá civilizační onemocnění, jako je obezita či diabetes, stále čeká na objasnění.

5.3.1 CNV *AMY1* a BMI, obezita

Vzhledem k podílu α-amylázy na trávení byl zkoumán její celkový vliv na metabolismus, energetický příjem, BMI (= index tělesné hmotnosti neboli body mass index) a tělesné proporce. Ze série provedených studií nevychází jednoznačná jednoduchá korelace mezi počtem kopií *AMY1* a BMI, váhou či výškou (Arredouani et al., 2016; Atkinson et al., 2018; Usher et al., 2015). Liší se i názory na to, zda a do jaké míry se do dat promítají další faktory, např. věk, pohlaví či původ. V některých studiích je navíc stanovené jen množství α-amylázy v séru, což je směs pankreatické i slinné amylázy v téměř shodném zastoupení obou složek (*Skrha and Stěpán, 1987). V těchto studiích tedy nelze jednoznačně určit míru vlivu samotné slinné formy.

Existuje skupina studií, které se shodují na vlivu počtu kopií *AMY1* a α-amylázy na BMI a riziko vzniku obezity. Nepanuje v nich však shoda na míře a okolnostech tohoto vlivu. V některých případech

je viditelná signifikantní korelace z celkového souboru dat. Výzkum provedený na asijských (konkrétně japonských a čínských) populacích poukazuje na asociaci mezi nízkou aktivitou amylázy v séru a zvýšeným rizikem vzniku obezity (Nakajima et al., 2011; Zhao et al., 2014). K tomuto modelu se přiklání studie provedená na několika australských jedincích s nadváhou či obezitou (Marquina et al., 2019), i další dvě studie na katarské populaci, z nichž jedna uvádí vyšší adipozitu u obyvatel Kataru arabského původu, kteří mají obecně nižší počty kopií *AMY1* než obyvatelé Kataru perského původu (Rossi et al., 2021). Druhá ze studií potvrzuje signifikantní inverzní asociaci mezi aktivitou slinné α-amylázy a BMI napříč katarskou populací (Al-Akl et al., 2022). V souladu s tím vychází i závěry studie na populaci Saúdské Arábie, kde nižší aktivita α-amylázy opět koreluje s vyšším rizikem obezity (Aldossari et al., 2019).

Také závěry studie z amerického kontinentu zaměřující se na mexickou populaci hovoří pro snížené riziko obezity shodně u dětí i dospělých s vyšším počtem kopií *AMY1* (León-Mimila et al., 2018). U dětské populace (6-10 let) v Alabamě se ukazuje signifikantní korelace nižšího počtu kopií s obezitou (Selvaraju et al., 2020; Venkatapoorna et al., 2019). Tato korelace je však podle jedné z provedených studií větší u dětí afroamerického původu než u těch euroamerického původu (Venkatapoorna et al., 2019). Švédská studie nicméně nachází výraznou souvislost mezi vyšším počtem kopií *AMY1* a nižším BMI i rizikem obezity u jedinců evropského původu. Předpokládá dokonce, že by CNV v *AMY1* mohlo odpovídat za 2,47 až 19,86% genetického vlivu na obezitu (Falchi et al., 2014). Studie provedená selektivně na populaci mexických dětí nicméně přichází se závěrem, že ke snížení rizika obezity u jedinců dochází až od určitého množství počtu kopií genu pro slinnou α-amylázu. Z hodnot BMI a vzorků DNA získaných pro tuto studii vyplývá, že průměrný počet kopií *AMY1* u obézních dětí (s přepočtem BMI na věk v rozmezí nad 95. percentilem) je nižší než u kontrol, které mají hodnotu BMI po přepočtu na věk pod 85. percentilem. K redukci obezity však nejvýrazněji přispívají nejvyšší počty kopií *AMY*1 a všechny děti s počtem diploidních kopií > 10 v této studii vykazují normální hmotnost. U nižšího počtu kopií *AMY1* (< 9) není signifikantní efekt na riziko vzniku obezity (Mejía-Benítez et al., 2015). Tento trend ukazuje i další ze studií, jež nachází inverzní asociaci mezi počtem *AMY1* a BMI pouze u jedinců s počtem ≥ 10 (Farrell et al., 2021). Studie na francouzské populaci uvádí silnou korelaci mezi aktivitou slinné či pankreatické amylázy a nižším BMI, nicméně obecně považuje roli počtu kopií *AMY1* ve snížení BMI za méně významnou (Bonnefond et al., 2017).

Existující ale nepříliš významnou negativní korelaci mezi CN *AMY1* a BMI potvrzuje i další ze studií, která však dále nenachází asociaci počtu kopií *AMY1* s jakýmikoli glykemickými parametry. Z kohorty jedinců s nadváhou či obezitou, kteří podstoupili nízkokalorickou dietu a následně přešli na rozdílné váhu-udržující diety, nevychází počet kopií *AMY1* jakožto relevantní biomarker pro klinické hubnoucí programy (Valsesia et al., 2019). Naopak jiná ze studií udává větší úbytek na váze při nízkokalorické dietě a vyšší úbytek adipozity u jedinců s vyšší amylázovou aktivitou a vyšším

množstvím počtu kopií (Heianza et al., 2017). Efekt se zesiluje s postupem času, což může být jedno z možných vysvětlení pro nezachycení tohoto trendu u předchozí kratší studie.

V některých studiích se ukazuje rozdílný vliv počtu kopií *AMY1* u opačných pohlaví. Na vzorku italských dětí školního věku se při studiu vztahu mezi BMI a CNV *AMY1* objevuje negativní korelace z-skóre BMI a počtu kopií pouze u chlapců. Jedinci tohoto pohlaví s 8 a více kopiemi *AMY1* mají z-skóre BMI výrazně nižší v porovnání s jejich vrstevníky s nižším počtem kopií. Stejně tak obvod pasu u chlapců v této studii negativně koreluje s počtem kopií *AMY1*. U dívek shodného věku není žádná ze závislostí viditelná. Stejně tak se neukazuje žádný přímý vliv počtu kopií *AMY1* na obezitu u celkové populace italských dětí obou pohlaví (Marcovecchio et al., 2016).

Finská studie však dochází k opačným závěrům. Vliv počtu kopií *AMY1* na dětskou obezitu se zde projevuje pouze u ženského pohlaví. Signifikantní inverzní korelaci mezi počtem kopií *AMY1* a BMI i procenty tělesného tuku dále pozorují také u mladých těžce obézních žen. Pro výrazný rozdíl vlivu mezi pohlavími mluví i další data, která ukazují vyšší přírůstek koncentrace celkového množství amylázy na kopii genu u obézních žen a nižší u obézních mužů. To by napovídalo nižší funkčnosti jednotlivých kopií genu u obézních mužů (Viljakainen et al., 2015).

V posledních letech byly nicméně provedeny i studie, které s tvrzením, že vyšší počet kopií *AMY1* snižuje riziko obezity, polemizují. Studie kohorty japonských žen s normální tělesnou hmotností nevykazuje žádnou signifikantní korelaci mezi počtem kopií *AMY1* a BMI (Higuchi et al., 2020). Další z výzkumů pak poukazují na trend korelace závislý na množství konzumovaného škrobu. Vztah mezi počtem kopií *AMY1* a BMI či procenty tělesného tuku se zde neukazuje, dokud jedince nerozřadíme do skupin dle obsahu škrobu v potravě. U jedinců s nízkým příjmem škrobu pak dochází k inverzní asociaci mezi počtem kopií *AMY1* a BMI, u skupiny s vyšším příjmem škrobu se projevuje pozitivní vztah mezi počtem kopií *AMY1* a BMI. Nejnižší průměrná hodnota BMI se ukazuje u skupiny s nižším počtem kopií *AMY1* a vyšším příjmem škrobu (Heianza et al., 2020; Rukh et al., 2017). Japonská studie pak pozitivní korelaci mezi počtem kopií *AMY1* a BMI nachází napříč celým vzorkem zkoumaných jedinců (Hasegawa et al., 2022). Možným vysvětlením by mohlo být to, že při nedokonalé metabolizaci škrobu na glukózu je celkový příjem energie z potravy menší a následně jí nemůže být v těle uloženo tolik (Rukh et al., 2017).

Vzhledem k počtu studií, které nachází inverzní korelaci mezi počtem kopií *AMY1* a BMI či obezitou, se jako pravděpodobnější jeví závěr, že takovýto vliv skutečně existuje. Nejedná se však o lineární závislost a ani zdaleka o jediný či nejvýraznější faktor obezitu ovlivňující. Vzhledem ke komplexitě tohoto onemocnění a počtu faktorů, které do vztahu mohou vstoupit, bude jistě nutné provést další a rozsáhlejší výzkum a pečlivěji vyhodnotit roli věku, pohlaví, etnicity či toho, jestli není efekt na obezitu jednoznačně prokazatelný až od určitého počtu kopií *AMY1*. Dále by se při studiu tohoto vztahu dalo zaměřit i na konkrétní příjem škrobu a sacharidů v každodenní stravě zkoumaných jedinců.

5.3.2 CNV AMY1 a inzulín, diabetes, glykemická odpověď

Vliv α-amylázy, jejího působení na glykemickou odpověď a produkci inzulínu, případně potenciální zvýšené riziko vzniku diabetu, patří mezi další hojně zkoumaná témata. Série studií se zde přiklání k závěru, že jedinci s vyšším množstvím produkované α-amylázy mají signifikantně nižší glykemickou odpověď po jídle s obsahem škrobu (Locia-Morales et al., 2022; Mandel and Breslin, 2012; Nakajima et al., 2011). Možným vysvětlením je, že hladinu glukózy v krvi ovlivňuje vyšší koncentrace inzulínu pozorovaná v prvních 9 minutách po začátku příjmu potravy u jedinců produkujících větší množství α-amylázy. Následně dochází k vyrovnání hladiny inzulínu u jedinců s vyšším i nižším počtem kopií genu pro α-amylázu. Celková koncentrace inzulínu v rozmezí dvou hodin po začátku přijímání potravy je srovnatelná u obou skupin.

Nabízí se závěr, že počet kopií *AMY1* a množství α-amylázy ovlivňuje preabsorpční uvolnění inzulínu, které brání chronické dlouhodobě vysoké koncentraci glukózy v krvi. Vyšší počet kopií tedy může zvýšenou preabsorpční produkcí inzulínu snižovat riziko vzniku diabetu (Mandel and Breslin, 2012; Zhang et al., 2023), tento vliv však nemusí být dominantní (Choi et al., 2015). Některé studie zmíněnou inverzní asociaci nacházejí pouze ve skupině jedinců s počtem kopií AMY1 ≥ 10 (Hamid et al., 2020). Dle jiných se riziko vzniku inzulinové rezistence zvyšuje u lidí s nízkým počtem *AMY1* (<6 diploidních kopií) s postupujícím věkem (Liu et al., 2020). Jednotlivé studie se rozcházejí v popisu mechanismu, jakým vyšší počet kopií snižuje riziko inzulínové rezistence, i zda je tento trend konstantní či proměnlivý.

S opačným tvrzením ohledně vztahu mezi počtem kopií *AMY1* a glykemickou odpovědí pak přichází další z výzkumů. Z něho vyplývá, že jedinci s vyšším počtem kopií *AMY1* efektivněji tráví škrob a po konzumaci potravin, které jej obsahují, mají vyšší hladinu cukru v krvi – tedy vyšší glykemickou odpověď – než jedinci s nižším počtem kopií *AMY1*. Nejsou zde známky rozdílné produkce inzulinu v návaznosti na počet kopií *AMY1* (Atkinson et al., 2018). Dochází tak k přesně opačným tvrzením než ve studii z roku 2012 (Mandel and Breslin, 2012). Tomu odpovídají již dříve získaná data, dle kterých naopak nižší počet kopií *AMY1* u mladých obézních žen může bránit vzniku inzulínové rezistence tím, že pomalejší a méně efektivní trávení škrobu vede k vyrovnanému vzrůstu hladiny glukózy v krvi (Viljakainen et al., 2015).

Rozdíl v glykemické odpovědi po jídle mezi jedinci s vyšším a nižším počtem kopií *AMY1* by mohl být opět provázán s obsahem škrobu v potravě. Studie, která porovnává hladiny glukózy a inzulínu v krvi, nachází výraznější zvýšení glukózy i inzulínu u jedinců s vyšším množstvím kopií *AMY1* oproti těm s menším počtem kopií při příjmu 40 g škrobu. U dvojnásobné dávky škrobu je rozdíl mnohem menší, až nesignifikantní. Může se zde jednat o saturační efekt. Dále je u jedinců s vyšším počtem kopií genů pro α-amylázu větší rozmezí glykemické a inzulínové odpovědi – jedinci s vyšším počtem kopií *AMY1* se tedy liší ve své odpovědi na příjem potravy více (Farrell et al., 2021).

Jedna ze studií na korejské populaci se nezabývá počtem kopií *AMY1*, ale pracuje s ještě komplexnějším pojetím. Rozlišuje jednotlivé varianty genu *AMY1* dle jednonukleotidových polymorfismů (SNPs). Předpokladem je, že tyto nesynonymní polymorfismy mají dodatečný vliv na produkci α-amylázy. Z šesti zkoumaných variant: rs10881197, rs4244372, rs6696797, rs1566154, rs1930212 a rs1999478 nachází studie u tří z nich: rs6696797, rs4244372 a rs10881197 asociaci s vyšší incidencí diabetu II. typu. To však platí pouze u žen, u nichž sacharidy odpovídají za více než 65 % energetického příjmu. Z této skupiny je pak nejvyšší incidence u žen s variantou rs6696797 nebo rs4244372 nesoucích minoritní alelu A, či rs10881197 s minoritní alelou G. U korejských mužů nebyla nalezena žádná signifikantní korelace (Shin and Lee, 2021).

Několik studií nicméně nenachází signifikantní vliv počtu kopií *AMY1* na inzulinovou rezistenci. Jednou z nich je poměrně robustní studie na katarské populaci (Al-Akl et al., 2021) a vliv amylázové aktivity v tomto směru popírá i další ze studií zaměřená na populaci francouzskou (Bonnefond et al., 2017). Studie prováděná na populaci mexických dětí nachází pozitivní asociaci mezi enzymatickou aktivitou pankreatické amylázy a inzulínovou rezistencí u obézních jedinců z této skupiny, i vliv amylázy v séru na hladinu glukózy v krvi po příjmu potravy, nicméně samotná α-amyláza ve slinách žádnou signifikantní míru vlivu nevykazuje. S tímto závěrem korespondují výsledky studie na mužské asijské populaci (se zastoupením etnik asijských indiánů, Číňanů a Malajců), která také neprokazuje žádnou asociaci mezi glykemickou odpovědí a amylázovou aktivitou či počtem kopií *AMY1*. Naopak dochází k závěru, že mezi počtem kopí *AMY1* a metabolismem sacharidů musí být jiný mechanismus vlivu (Tan et al., 2016). Ani menší studie zaměřená na čínskou populaci neudává žádnou signifikantní korelaci mezi počtem kopií *AMY1* a inzulínovou rezistencí, potažmo diabetem II. typu (Lv et al., 2023). Stejné závěry se pak dají vyvodit i z kanadské a australské studie na toto téma (Marquina et al., 2019; Wolever et al., 2021).

Některé další studie pozorují zvýšené množství α-amylázy ve slinách u neléčených pacientů s diabetem II. typu oproti léčeným pacientům i kontrolám (*Aydin, 2007; *Dodds and Dodds, 1997; Kheirmand Parizi et al., 2019). Tyto studie se však nezabývaly kauzalitou těchto jevů. A i v tomto případě se vyskytují studie ukazující pravý opak (Prathibha et al., 2013; Yavuzyilmaz et al., 1996), či nenacházející signifikantní změny (Carda et al., 2006).

Vzhledem k rozporuplným výsledkům i jejich interpretacím není zatím možné udělat jednoznačný závěr ohledně vztahu množství α-amylázy, produkce inzulínu a rizikem vzniku diabetu. Budoucí výzkum by se tedy měl – kromě přesného mechanismu glykemické odpovědi na proporci stráveného škrobu – zaměřit i na jednotlivé faktory, které k riziku přispívají. Zdá se také důležité provázat počet kopií *AMY1* s konkrétním množstvím škrobu, které je zvyklý daný jedinec konzumovat, a dále vzít v úvahu to, že se reakce metabolismu může lišit i u konkrétního jedince mezi jednotlivými jídly. Míra rozdílu se pak může lišit u jedinců s nižším a vyšším množstvím kopií genu pro α-amylázu.

Výrazný deficit je pak v zohledňování SNPs. Ty byly prozatím zahrnuté jen v minimu studií, které však naznačují, že by mohly mít vliv na incidenci diabetu II. typu.

5.3.3 Vliv amylázy v souvislosti s mikrobiomem

Faktorem vstupujícím do vztahu mezi α-amylázou, stravovacími návyky a potažmo nárůstem či poklesem hmotnosti může být také střevní mikrobiota. Ta by však zároveň mohla být ovlivňována aktivitou α-amylázy. Studie se v této souvislosti zaměřují především na výskyt bakterie rodu *Prevotella* (Christensen et al., 2022; León-Mimila et al., 2018), případně na poměr zastoupení rodů *Prevotella* a *Bacteriodes* (Hjorth et al., 2020) ve střevech. Dánská studie poukazuje na roli, kterou hraje poměr P/B spolu se složením stravy u změn hmotnosti jedinců s nižším počtem kopií *AMY1*. Úbytek na váze u subjektů s vysokým počtem kopií genu *AMY1* se neliší u skupin dle poměru P/B a přijímané stravy. Zato jedinci s nižším počtem kopií *AMY1* se liší v reakci na typ stravy dle zastoupení P/B.

Nabízí se vysvětlení, že u nižšího počtu kopií *AMY1* je větší podíl nestráveného škrobu, který doputuje do tlustého střeva. Tam jeho osud záleží převážně na zpracování mikrobiotou. Ta v tomto případě tedy hraje výraznější roli, než u jedinců s vyšším počtem kopií *AMY1* (Hjorth et al., 2020). Tímto principem by podle další studie mohla být vysvětlena i vyšší produkce metanu při trávení škrobu u jedinců s nižším počtem kopií genu *AMY1* (Atkinson et al., 2018). Dánské studii dává částečně za pravdu další výzkum. Ten udává pozitivní vliv výskytu bakterií *Prevotella* na hubnutí při celozrnné dietě u jedinců s nízkým počtem kopií *AMY1*. U jedinců s vyšším počtem kopií genu *AMY1* s výhradně celozrnnou stravou se neukazuje žádný rozdíl úbytku na váze související se zastoupením *Prevotella* v mikrobiomu. Stejně tak při konzumaci běžně procesovaných potravin není patrný vliv množství kopií *AMY1* na hubnutí či změnu poměru tělesného tuku. Zastoupení *Prevotella* v mikrobitě střev taktéž nemá vliv (Christensen et al., 2022).

Některé studie nacházejí pozitivní korelaci mezi množstvím bakterií rodu *Prevotella* v mikrobiomu střeva a počtem kopií *AMY1*. Signifikantní je tento vztah však pouze u dospělých jedinců (León-Mimila et al., 2018). Další data udávají, že mikrobiota ve střevech jedinců s vyšším počtem kopií *AMY1* obsahuje větší množství nejen bakterií rodu *Prevotella,* ale také rodu *Ruminococcus.* Dle těchto závěrů se zdá, že s větším množstvím kopií *AMY1* dochází ve střevní mikroflóře k nabohacení taxonů zodpovědných za trávení rezistentního škrobu (Poole et al., 2019). Ještě novější studie nachází korelaci mezi počtem kopií *AMY1* a rozsáhlejší skupinou rodů mikroorganismů ve střevech. Pozitivní korelaci udává u rodů *Klebsiella*, *Granulococcus*, *Escherichia*/*Shigella* a *Rothia*. Negativní korelace se vyskytuje u rodů *Clostridium_IV, Anaerovorax*, *Alistipes, Sporobacter*, *Bacteroides* a *Parabacteroides* (Lv et al., 2023).

Stejně tak vztah mezi mikrobiotou a počtem kopií *AMY1* ukazuje i studie zaměřující se na prostředí ústní dutiny. Zde se projevuje negativní korelace mezi množstvím gram-negativních bakterií

rodu *Capnocytophaga* a počtem kopií *AMY1*. U bakterií rodu *Dialister* jsou mezipohlavní rozdíly v korelaci, neboť se zdá, že dochází ke zvýšení jeho zastoupení u mužů při vyšším počtu kopií genu *AMY1*, zatímco u žen je v tomto případě zastoupení *Dialister* v ústním mikrobiomu menší (Hasegawa et al., 2022). Další studie mluví o celkově bohatším mikrobiomu v ústech u jedinců s vyšším počtem kopií *AMY1* (Poole et al., 2019).

Počet kopií *AMY1* by tedy (v návaznosti na množství produkované α-amylázy) mohl ovlivňovat složení orálního i střevního mikrobiomu (Poole et al., 2019). Ten se pak dále podílí na celkovém zisku živin a na změnách hmotnosti tam, kde vlivem nižší produkce α-amylázy dochází k natrávení menší části přijatého škrobu. Nicméně ani v tomto případě nevyznívají všechny výsledky jednomyslně a některé studie vliv počtu kopií *AMY1* na mikrobiom nenachází (Farrell et al., 2021; Hjorth et al., 2020).

5.3.4 Další možné vlivy počtu kopií *AMY1* na lidský organismus

Zkoumaný je také vliv aktivity a množství amylázy v séru na metabolický syndrom (MetS), což je skupina onemocnění zahrnující obezitu, hypertenzi, hyperglykémii, zvýšenou viskozitu krve, hyperinsulinemii, hyperurikémii, dyslipidémii a steatózu jater. Byť studií na toto téma není mnoho, ty, které jsou prozatím k dispozici, vykazují signifikantní asociaci mezi nižším množstvím amylázy v séru a větším rizikem vzniku metabolického syndromu u japonské (Nakajima et al., 2011) i čínské (Zhan et al., 2021) populace. V čínské studii navíc skupina jedinců s metabolickým syndromem vykazovala mírně nižší počet kopií *AMY1* oproti kontrolám, nicméně rozdíl nebyl statisticky signifikantní. Potenciálním biomarkerem pro zvýšené riziko MetS by tedy mohla být jen celková nižší aktivita amylázy v séru, kde má své zastoupení i slinná α-amyláza, byť její role v tomto případě nebude klíčová (Zhan et al., 2021).

Studie na jedincích s nadváhou a obezitou udává zvýšenou koncentraci LDL cholesterolu u jedinců s nižším počtem kopií *AMY1* (≤ 4), u dalších lipidů v séru však korelace zjištěná nebyla (Marquina et al., 2019). Naopak starší studie na francouzské populaci udává pouze vztah mezi vyšší aktivitou α-amylázy a vyšší koncentrací HDL cholesterolu, žádný signifikantní vztah s LDL se neprokázal (Bonnefond et al., 2017). Žádný rozdíl se neobjevil mezi skupinami s nízkým a vysokým počtem kopií *AMY1* ani u jiných kardiovaskulárních parametrů. Nicméně nižší počet kopií genu pro α-amylázu odpovídal vyšší koncentraci inflamatorních markerů jako jsou IL-6, IL-1β, TNF-α a MCP. Stejně tak byla u zmíněné skupiny zvýšená koncentrace adiponektinu a lektinu – signifikance v tomto případě však mizí po adjustaci na množství tukové tkáně (Marquina et al., 2019).

Z těchto výsledků vyplývá, že obézní jedinci či jedinci s nadváhou a nižším počtem kopií *AMY1* mohou mít horší kardiometabolický a prozánětlivý profil a zvýšené riziko kardiovaskulárních onemocnění (Marquina et al., 2019). Poměrně robustní výzkum vlivu počtu kopií *AMY1* na kardiovaskulární onemocnění u populace evropského původu nicméně nenachází spojitost mezi těmito

fenomény, ani mezi počtem kopií *AMY1* a množstvím proteinů v plazmě asociovaných právě se zmíněným onemocněním. Vliv počtu kopií *AMY1* na mortalitu se v této souvislosti také neprojevuje (Li et al., 2023).

Dle další studie by však počet kopií genu pro α-amylázu mohl hrát roli v metabolismu lipidů. Skupina žen s nižším počtem kopií *AMY1* vykazuje dle jedné ze studií v séru vyšší zastoupení derivátů dikarboxylových kyselin suberátu, sebakátu, azelátu a dodekanoátu v porovnání se skupinou žen s počtem kopií *AMY1* > 4. Tyto výsledky napovídají možné upregulaci ω-oxidace, která za normálních okolností hraje v těle menší roli než β-oxidace mastných kyselin. Skupina žen s nižším počtem kopií *AMY1* má dále sníženou koncentraci mastných kyselin s dlouhým řetězcem v séru a zvýšené množství 2-hydroxybutyrátu, což je biomarker pro inzulínovou rezistenci. Celkově se zdá, že u žen s nižším počtem kopií genu *AMY1* dochází ke snížené absorpci glukózy buňkami, její množství je v séru lehce zvýšené. Metabolismus následně zvyšuje využití lipidů (Arredouani et al., 2016).

5.3.5 Shrnutí vlivu amylázy na metabolismus

Celkově lze považovat vliv α-amylázy a počtu kopií *AMY1* za pravděpodobně existující u tělesné hmotnosti, glykemické odpovědi i rizika diabetu II. typu. Náznaky provázanosti s počtem kopií *AMY1* a množstvím α-amylázy se ukazují i u složení mikrobiomu (ať už v ústech či střevech). Přesné mechanismy působení však bude potřeba definovat či ověřit budoucím výzkumem. U vlivů na metabolismus lipidů, koncentraci inflamatorních markerů či na riziko metabolického syndromu a kardiovaskulárních onemocnění není výzkum dostatečně robustní na to, aby z něj mohly být vyvozeny obecnější závěry.

Co se týče rozporuplnosti výsledků výše citovaných studií, mohou být dány řadou parametrů. Vztah mezi počtem kopií *AMY1*, množstvím a aktivitou α-amylázy může být narušen vnějšími vlivy a životním stylem (např. cigaretové komponenty aktivitu proteinu výrazně snižují) (Choi et al., 2015). Mezi počtem *AMY1* a obezitou, BMI, či inzulínovou rezistencí nenacházíme jednoduchou korelaci, neboť se jedná o multifaktoriální fenomény. Do tohoto vztahu může vstupovat bezpočet dalších vlivů (ať už genetických či vnějších) a najít přesnou roli, kterou počet kopií *AMY1* v tomto komplexním systému hraje, je obtížné. K odlišnostem jistě přispívají i parametry, na kterých jsou jednotlivé studie postavené. Může se jednat o rozdílnost v komplexitě výběru jedinců a jejich životních stylů. Dále se liší robustnost studií, neboť do některých byly zahrnuty tisíce případů, zatímco jiná data vychází ze skupiny desítky jedinců.

Využité kvantifikační a statistické metody opět generují odlišnosti. V tomto případě je často diskutován způsob určení počtu kopií *AMY1*. Mnoho ze zmiňovaných výzkumů využilo k tomuto účelu kvantitativní PCR (qPCR) či droplet digital PCR (ddPCR). Jejich citlivost je s největší pravděpodobností rozdílná do té míry, že může ovlivnit výsledná data a tím i závěry z nich vyvozené.

U bukálních i slinných vzorků se objevuje signifikantní rozdíl mezi počtem kopií *AMY1* stanoveným qPCR a ddPCR, které je obecně považováno za citlivější metodu (Eisfeldt et al., 2018; Ooi et al., 2017). Zda je nutné v tomto ohledu provést revizi dat získaných qPCR, či zda budou ověřena a potvrzena, je také předmětem další debaty a následného výzkumu.

6 Potravní adaptace v lidské evoluci

V lidské historii došlo k několika změnám složení potravy. Poslední markantní změnou byl přechod na dnešní, intenzivní zemědělskou produkcí pěstované plodiny a vysoce procesovanou stravu. Ve vzdálenější minulosti byly výraznými změnami tepelná úprava jídla, nárůst konzumace masa, mléčných výrobků či mnohokrát zmíněného škrobu. Důležitým milníkem byla zemědělská tranzice a počátky domestikace zvířat a rostlin. S těmito změnami došlo k zisku nových genových funkcí a pozitivní selekci, případně ke ztrátě funkce genů jiných (Mathieson and Mathieson, 2018; Perry et al., 2015). *AMY1* je jen jedním z několika známých genů, pomocí nichž můžeme vytvořit obrázek o změnách stravovacích návyků v historii lidského druhu. Adaptace na tyto změny pak mají relevanci i pro dnešní společnost a mohou poskytovat vysvětlení vzniku některých civilizačních onemocnění.

6.1 Přehled známých adaptací na změny stravovacích návyků v lidské evoluci

Mezi nejlépe prozkoumané případy pozitivní selekce v nedávné minulosti lidského druhu patří vývoj genu pro laktázu, *LCT*. Laktáza je zodpovědná za trávení mléčného cukru, laktózy, ke kterému dochází u mláďat savčích druhů převážně v průběhu kojení. Po jejich odstavení dochází k zastavení exprese genu. U populací moderních lidí jsou však pozorovány mutace v *LCT* genu, které zajišťují jeho expresi i v dospělosti (*Ingram et al., 2009). Tato tzv. laktázová perzistence má nejvyšší zastoupení v severoevropských státech a její geografická distribuce odpovídá zvýšenému výskytu chovu dojnic a hojné konzumaci mléka (a mléčných výrobků) v minulosti (Bersaglieri et al., 2004; *Scrimshaw and Murray, 1988). K jejímu vzniku pravděpodobně došlo po osídlení Evropy a oddělení evropských populací od afrických i asijských. Nejrozšířenější alela pro tento fenotyp se objevuje v rozmezí před 9-6 tisíci lety, nicméně její frekvence na současnou hladinu vystoupala kolem roku 1200 našeho letopočtu (Burger et al., 2007; Itan et al., 2009). Velmi silná pozitivní selekce, která vznik laktázové perzistence následovala, dokládá význam mléčných výrobků pro lidskou stravu (Bersaglieri et al., 2004). Opačný stav – laktázová deficience – je jednou z příčin laktózové intolerance a problémů s ní spojených (Swallow, 2003)

Pravděpodobná relaxace pozitivní selekce se projevuje u genu pro arylamine N-acetyltransferázu, *NAT2*. Arylamine N-acetyltransferáza je enzym, který pomáhá metabolizovat xenobitika a v současné době tedy odpovídá i za reakci organismu na určitá léčiva. Dle daného haplotypu

může v organismu docházet k rychlé nebo pomalé acetylaci těchto látek (Patin et al., 2006; Vangenot et al., 2019). U zemědělců a pastevců se celosvětově projevuje spíše pomalejší typ acetylace, zatímco u lovců-sběračů je mnohem častější acetylace rychlejší. Právě ta je považována za původní. Pomalu-acetylující fenotyp se objevuje v západní a střední Evropě v rozmezí před 7-5 tisíci lety – tedy po agrikulturní tranzici – a vzrůst frekvence jeho výskytu je zde poměrně rychlý (Patin et al., 2006; Sabbagh et al., 2011). Jeho největší zastoupení nacházíme u jedinců na Středním východě, což je jedno z prvních míst, kde bylo před 10 tisíci lety zavedeno zemědělství (Patin et al., 2006). Další výzkum tohoto procesu a geografického rozložení alel by mohl pomoci v personalizované medicíně, neboť poskytne informace o metabolizaci léků různými jedinci.

Další z předpokládaných adaptací na změnu složení stravy u lidských populací je u genů *FADS1* a *FADS2*. Jimi kódované proteiny hrají roli katalyzátorů v biosyntéze lipidů – konkrétně v dráze syntetizující polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (*Glaser et al., 2010). Zatímco u stravy, která obsahuje větší množství masa, případně mořských plodů, je velké množství těchto MK rovnou přijímáno v potravě, a tedy aktivita *FADS1* a *FADS2* může být nižší, u převážně rostlinné stravy je tomu naopak. Z tohoto důvodu byly geny *FADS1* a *FADS2* v lidské evoluci vystaveny pozitivní selekci k vyšší či nižší expresi dle přijímané stravy (Ameur et al., 2012). Haplotyp zvyšující expresi *FADS1* se objevuje pravděpodobně po oddělení linií moderních lidí a neandertálců, u kterých nacházíme jen jeho nekompletní sekvenci (Green et al., 2010). K selekci a fixaci tohoto haplotypu došlo v Africe pravděpodobně cca před 85 000 lety (a tedy před událostí *out-of-Afrika*). Poté se tento fenotyp dostal do euroasijského prostoru (Mathias et al., 2012), kde se jeho frekvence mírně zvýšila po vzniku zemědělství (kolem období před 8 500 lety). Výraznější známky selekce jsou však patrné až od období před 4 tisíci lety do současnosti. Zdá se tedy, že zemědělská tranzice neměla bezprostřední vliv na tvorbu současné frekvence zastoupení alely *FADS1* se zvýšenou expresí. Pro dnešní dobu může mít zastoupení rozdílných haplotypů *FADS1* a *FADS2* význam pro náchylnost jedinců i populací k metabolickým onemocněním asociovaných s lipidy a jejich metabolismem (Mathieson and Mathieson, 2018).

Kromě prezentovaných případů pozitivní selekce docházelo v evoluci také ke ztrátám funkcí genů a mutacím znemožňujícím jejich expresi. Příkladem tohoto trendu je gen pro sarkomerický myosin, *MYH16*, který není u člověka exprimován. V důsledku toho jsou žvýkací svaly člověka méně masivní než u ostatních primátů (Stedman et al., 2004). Panuje předpoklad, že ke ztrátě exprese *MYH16* došlo po ovládnutí ohně homininy a je spojená s konzumací měkčí, tepelně upravené stravy (Wrangham and Conklin-Brittain, 2003). Tato ztráta se vyskytuje nejen u moderních lidí, ale také u neandertálců a denisovců. S ohledem na to mohla být datována do období před 2,4 miliony lety (Perry et al., 2015; Stedman et al., 2004), což zhruba odpovídá období, kdy se rozšířilo tepelné zpracovávání potravy (*Wrangham et al., 1999).

S přechodem na rozdílné složky potravy s největší pravděpodobností souvisí i mutace v genech pro receptory hořké chuti *TAS2R62* a *TAS2R64*. Výskyt předčasných stop kodonů v sekvencích těchto genů je opět specifický právě pro homininy. V této linii se ukazuje zvýšená míra pseudogenizace u genů pro receptory hořké chuti T2R, která vrcholí u člověka (Go et al., 2005). Vzhledem k tomu, že si v tomto místě odpovídají referenční sekvence genomů moderních lidí, neandertálců i denisovců, dochází ke ztrátě funkce dvou zmíněných genů pravděpodobně ještě před oddělením těchto linií. Časový odhad hovoří o období před 590-550 tisíci lety. Panuje předpoklad, že naši předci v tu dobu přestali konzumovat plody, které obsahují látky tyto receptory aktivující, a ty tedy pozbyly svůj význam. Nicméně zatím nevíme s jistotou, jaké molekuly jsou receptory TAS2R62 a TAS2R64 rozpoznávány (Perry et al., 2015). Identifikace těchto molekul by pomohla upřesnit, k jaké změně stravy se ztráta funkce *TAS2R62* a *TAS2R64* může vztahovat.

6.2 Chronologický přehled evolučních změn dle subsistence

Z výše zmíněných informací lze sestavit zjednodušený obrázek evoluce genů moderního člověka a jeho předků v odpovědi na změny složení a struktury konzumované stravy.

K oddělení linií člověka a šimpanzů dochází zhruba před 6 miliony let a od té doby hovoříme o samostatném vývoji postupně až k rodu *Homo*. U tohoto rodu dochází dle některých zdrojů před 2,4 milionu let ke ztrátě exprese genu *MYH16*, čímž se zmenšují žvýkací svaly (Perry et al., 2015). Zhruba v podobnou dobu akceleruje zvětšování mozku u rodu *Homo* (před 2 miliony let) a strava je nově tepelně upravována (před 1,9 miliony let) (Hardy et al., 2015). Jiné studie pak kladou ztrátu exprese genu *MYH16* do období těsně po objevu využívání ohně a přisuzují ji právě změkčení konzumované potravy její tepelnou úpravou (Wrangham and Conklin-Brittain, 2003). Na přesném pořadí událostí tedy nepanuje shoda, nicméně předpokládá se, že k nim došlo v přibližně podobném časovém úseku.

Zvětšující se mozek má větší energetické nároky na organismus a musí docházet k zefektivnění trávení. K tomu mohlo přispět jednak tepelné zpracování potravy, ale také zmnožení genu pro α-amylázu ve slinách. Jak již bylo zmíněno, na období původního zmnožení nepanuje v literatuře shoda a udávané rozmezí sahá od doby před cca 6 miliony lety (Samuelson et al., 1990) do doby před cca 700 tisíci lety (Yilmaz et al., 2023). Zhruba v tomto období se škrob stal důležitou součástí lidské stravy (Fellows Yates et al., 2021). V období před 590-550 tisíci lety pak u rodu *Homo* dochází ke ztrátě exprese 2 genů pro hořkou chuť *TAS2R62* a *TAS2R64*, což bylo pravděpodobně v reakci na úbytek konzumace prozatím nespecifikované složky potravy (Perry et al., 2015).

Před 400 tisíci lety dochází k definitivnímu oddělení linie moderních lidí od neandertálců (Langergraber et al., 2012). V linii moderních lidí dochází ještě na území Afriky (před cca 85 000 lety) k selekci a fixaci haplotypu s vyšší expresí genu *FADS1* a následně vyšší míře biosyntézy

polynenasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem (Mathias et al., 2012). Ohledně vývoje genu *AMY1* se v této fázi objevuje spor o to, zda měli 3 kopie genu *AMY1* již neandertálci (Samuelson et al., 1990; Yilmaz et al., 2023), či jestli k druhé duplikaci genu pro amylázu došlo odděleně až kolem doby před 200 tisíci lety (Perry et al., 2015). Nicméně na tom, že vyšším počtem kopií genu pro amylázu než původními dvěma disponovali populace anatomicky moderního člověka již před vznikem zemědělství, panuje shoda. Uváděný počet kopií genu *AMY1* u prvních zemědělců se ale v různých studiích liší (Inchley et al., 2016; Mathieson and Mathieson, 2018; Perry et al., 2015; Yilmaz et al., 2023).

S agrikulturní tranzicí před 10 tisíci lety se pak míra konzumace škrobu zvyšuje, což pravděpodobně vede k pozitivní selekci pro zvýšení kopií *AMY1* (Perry et al., 2007). Se změnou životního stylu, domestikací rostlin i zvířat a s využíváním jejich produktů se pojí další dvě významné genotypové a fenotypové změny. Jednou z nich je selekce genu pro laktázovou perzistenci. Ta se objevuje spolu s konzumací mléka a mléčných výrobků právě od období před 10 tisíci lety primárně u evropských populací. Objev nejrozšířenější alely pro tento fenotyp sahá 9-6 tisíc let zpátky. Jedná se o nejlépe zdokumentovaný případ nedávné pozitivní selekce u člověka (Bersaglieri et al., 2004; Perry et al., 2015). Druhou novinkou je před 7-5 tisíci lety pomalu-acetylující fenotyp při metabolizaci xenobiotik, kde se u genu pro enzym arylamin N-acetyltransferáza, *NAT2*, projevuje relaxace pozitivní selekce ve prospěch rychlé acetylace. Tento jev bývá dáván do souvislosti s větší kontrolou nad konzumovanými plodinami, kterou zemědělci na rozdíl od lovců-sběračů mají, a tedy snížením tlaku na schopnost metabolizovat případné jedovaté látky (Patin et al., 2006).

V následujících obdobích evoluce moderního člověka dochází k dalšímu zmnožování počtu kopií u genu pro α-amylázu ve slinách, jehož nejvyšší udávaná hodnota je v současnosti až 27 diploidních kopií (Marcovecchio et al., 2016). Od období před zhruba 4 tisíci lety je také zřetelná pozitivní selekce haplotypu s větší expresí genu *FADS1* u evropské populace. Ta vede až k současné frekvenci výskytu tohoto haplotypu, která bývá udávána na 60 % (Mathieson and Mathieson, 2018). Dále také pokračuje výrazná pozitivní selekce pro laktázovou perzistenci, která dosahuje současné frekvence zhruba v období středověku (Burger et al., 2007). U jednotlivých populací se však vyskytují odchylky – nejvyšší míra laktázové perzistence je v severní Evropě, nižší je poté v jižní a střední Evropě, a opět vyšší u pasteveckých populací v Africe. Nejnižší frekvenci laktázové perzistence nacházíme u nepasteveckých asijských a afrických populací (Tishkoff et al., 2007).

7 Závěr

Tato bakalářská práce shrnuje dosavadní poznatky týkající se evolučního vývoje variability v genech *AMY1*, které u člověka kódují α-amylázový izoenzym exprimovaný ve slinných žlázách a uvádí je do kontextu ostatních, především výživových adaptací člověka. Představuje současný pohled na možné

působení pozitivní selekce na tyto geny s ohledem na stravu lidských populací v minulosti. Dále nastiňuje důsledky, které takto podmíněná diverzita má na metabolismus, zpracovávání škrobu a některá civilizační onemocnění.

Výzkum v oblasti evolučního vývoje počtu kopií *AMY1* je v mnoha aspektech prozatím nejednotný. V převažující části studií nicméně panuje předpoklad, že minimálně k první duplikaci genu *AMY1* došlo ještě před oddělením linií anatomicky moderních lidí od neandertálců. Nejasnosti panují ohledně počtu kopií genu u neandertálců, a tedy období, kdy mělo dojít k druhé duplikaci genu pro α-amylázu ve slinách. V literatuře se lze setkat s rozmezím 700-200 tisíc let, které zahrnuje období před i po divergenci obou populací. Další zmnožování genu pak probíhalo v linii vedoucí k modernímu člověku. Oproti původní představě, že pozitivní selekce působila na tento lokus až po agrikulturní tranzici, je dnes na základě provedených studií pravděpodobnější, že selekce působila od ranějšího období.

Škrob byl prokazatelně součástí lidské stravy již před přechodem k zemědělství, a selekční tlaky se tedy mohly objevit dříve. Následné zmnožování kopií v průběhu vývoje anatomicky moderních lidí pak odpovídá obsahu škrobu v potravě jednotlivých populací. Dnešní rozmezí sahá od 1 až do 27 diploidních kopií a rozdíly v jejich počtu nacházíme primárně mezi populacemi konzumujícími malé a velké množství škrobu. Právě na základě tohoto poznatku byla prvně formulována teorie pozitivní selekce působící na geny amylázového lokusu. Byť se najdou i studie, které s touto hypotézou nesouhlasí, ve většině případů je přijímána jako stále platná. Navíc doposud nebylo podáno jiné vysvětlení pro mezipopulační rozdíly v počtu kopií kromě selekce navázané na množství konzumovaného škrobu.

Vzhledem k tomu, že se α-amyláza ve slinách podílí na trávení škrobu, probíhá výzkum vlivu počtu kopií *AMY1* a množství produkované amylázy na lidský metabolismus a některé patologie. Většina studií v tomto ohledu však dochází k rozporuplným výsledkům a výzkum v této oblasti ještě zdaleka není u konce. I když se zdá, že určitá asociace mezi počtem kopií *AMY1*, potažmo množstvím slinné izoformy α-amylázového enzymu, existuje u obezity, glykémie a diabetu II. typu, jejich vliv bude spíše menší. Do jejich působení vstupují modifikace aktivity α-amylázy dle prostředí ústní dutiny a stavu organismu, složení mikrobiomu, celkové genetické pozadí a případně také etnické, mezipohlavní a věkové rozdíly. Samozřejmě se mohou projevit i rozdíly mezi evoluční adaptací na určitou stravu a současnou vysoce procesovanou potravu.

Se změnou metod využívaných k určení počtu kopií genu bude možná nutné některá původní data získaná méně senzitivní qPCR ověřit dnes častěji používanou ddPCR. Všechny tyto vlivy do výzkumů na téma predispozic k obezitě, diabetu II. typu, kardiovaskulárních onemocnění či metabolického syndromu s ohledem na počet kopií *AMY1* vstupují. Pokud tedy opravdu chceme stanovit

roli CNV *AMY1* a α-amylázy pro lidský organismus, bude potřeba hlubší pochopení metabolických funkcí a jejich variability mezi jedinci i populacemi.

Geny pro α-amylázu však zdaleka nejsou v lidské evoluční historii jediné podléhající selekci s ohledem na měnící se složení lidské stravy. Tato práce proto krátce prezentuje několik dalších genů souvisejících s potravními adaptacemi. Pozitivní selekci, byť v rozdílné míře, podléhaly geny pro laktázu *LCT*, arylamine N-acetyltransferázu *NAT2* či katalyzátory biosyntézy polynenasycených MK s dlouhým řetězcem *FADS1* a *FADS2*. Negativní selekce pak působila na geny pro sarkomerický myosin *MYH16* a pro receptory hořké chuti *TAS2R62* a *TAS2R64*. Význam v sestavení přehledu těchto změn nespočívá pouze v pochopení části evoluční historie lidského druhu, nicméně také v pochopení jejich současné role v lidském metabolismu a variability mezi populacemi nebo jedinci. Na základě znalosti vlivů jednotlivých odlišností pak bude v budoucnu možné sestavovat do větší míry personalizované diety, plán léčby některých civilizačních onemocnění, případně stanovit riziko jejich vzniku. Výzkum v tomto ohledu a další prohlubování znalostí evoluční historie, selekčních tlaků a jejich příčin může v budoucnu pomoci osvětlit fungování lidského organismu jako celku.

8 Použitá literatura

(* značí sekundární citaci)

Al-Akl, N., Thompson, R.I., Arredouani, A., 2022. Elevated levels of salivary α- amylase activity in saliva associated with reduced odds of obesity in adult Qatari citizens: A cross-sectional study. PloS One 17, e0264692. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264692

Al-Akl, N.S., Thompson, R.I., Arredouani, A., 2021. Reduced odds of diabetes associated with high plasma salivary α-amylase activity in Qatari women: a cross-sectional study. Sci. Rep. 11, 11495. https://doi.org/10.1038/s41598-021-90977-y

Aldossari, N.M., El Gabry, E.E., Gawish, G.E.H., 2019. Association between salivary amylase enzyme activity and obesity in Saudi Arabia. Medicine (Baltimore) 98, e15878. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000015878

Amado, F., Lobo, M.J.C., Domingues, P., Duarte, J.A., Vitorino, R., 2010. Salivary peptidomics. Expert Rev. Proteomics 7, 709–721. https://doi.org/10.1586/epr.10.48

Ameur, A., Enroth, S., Johansson, A., Zaboli, G., Igl, W., Johansson, A.C.V., Rivas, M.A., Daly, M.J., Schmitz, G., Hicks, A.A., Meitinger, T., Feuk, L., van Duijn, C., Oostra, B., Pramstaller, P.P., Rudan, I., Wright, A.F., Wilson, J.F., Campbell, H., Gyllensten, U., 2012. Genetic adaptation of fatty-acid metabolism: a human-specific haplotype increasing the biosynthesis of long-chain omega-3 and omega-6 fatty acids. Am. J. Hum. Genet. 90, 809–820. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.03.014

Arredouani, A., Stocchero, M., Culeddu, N., Moustafa, J.E.-S., D.E.S.I.R. Study Group, Tichet, J., Balkau, B., Brousseau, T., Manca, M., Falchi, M., 2016. Metabolomic Profile of Low–Copy Number Carriers at the Salivary α-Amylase Gene Suggests a Metabolic Shift Toward Lipid-Based Energy Production. Diabetes 65, 3362–3368. https://doi.org/10.2337/db16-0315

Atkinson, F.S., Hancock, D., Petocz, P., Brand-Miller, J.C., 2018. The physiologic and phenotypic significance of variation in human amylase gene copy number. Am. J. Clin. Nutr. 108, 737–748. https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy164

*Aydin, S., 2007. A comparison of ghrelin, glucose, alpha-amylase and protein levels in saliva from diabetics. J. Biochem. Mol. Biol. 40, 29–35. https://doi.org/10.5483/bmbrep.2007.40.1.029

*Bank, R.A., Hettema, E.H., Arwert, F., Amerongen, A.V., Pronk, J.C., 1991. Electrophoretic characterization of posttranslational modifications of human parotid salivary alpha-amylase. Electrophoresis 12, 74–79. https://doi.org/10.1002/elps.1150120114

Behringer, V., Borchers, C., Deschner, T., Möstl, E., Selzer, D., Hohmann, G., 2013. Measurements of salivary alpha amylase and salivary cortisol in hominoid primates reveal within-species consistency and between-species differences. PloS One 8, e60773. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060773

Bersaglieri, T., Sabeti, P.C., Patterson, N., Vanderploeg, T., Schaffner, S.F., Drake, J.A., Rhodes, M., Reich, D.E., Hirschhorn, J.N., 2004. Genetic signatures of strong recent positive selection at the lactase gene. Am. J. Hum. Genet. 74, 1111–1120. https://doi.org/10.1086/421051

*Boehlke, C., Zierau, O., Hannig, C., 2015. Salivary amylase - The enzyme of unspecialized euryphagous animals. Arch. Oral Biol. 60, 1162–1176. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.05.008

Bonnefond, A., Yengo, L., Dechaume, A., Canouil, M., Castelain, M., Roger, E., Allegaert, F., Caiazzo, R., Raverdy, V., Pigeyre, M., Arredouani, A., Borys, J.-M., Lévy-Marchal, C., Weill, J., Roussel, R., Balkau, B., Marre, M., Pattou, F., Brousseau, T., Froguel, P., 2017. Relationship between salivary/pancreatic amylase and body mass index: a systems biology approach. BMC Med. 15. https://doi.org/10.1186/s12916-017-0784-x

Burger, J., Kirchner, M., Bramanti, B., Haak, W., Thomas, M.G., 2007. Absence of the lactase-persistence-associated allele in early Neolithic Europeans. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 3736–3741. https://doi.org/10.1073/pnas.0607187104

Carda, C., Mosquera-Lloreda, N., Salom, L., Gomez de Ferraris, M.E., Peydró, A., 2006. Structural and functional salivary disorders in type 2 diabetic patients. Med. Oral Patol. Oral Cirugia Bucal 11, 309–314.

Carpenter, D., Dhar, S., Mitchell, L.M., Fu, B., Tyson, J., Shwan, N.A.A., Yang, F., Thomas, M.G., Armour, J.A.L., 2015. Obesity, starch digestion and amylase: association between copy number variants at human salivary (AMY1) and pancreatic (AMY2) amylase genes. Hum. Mol. Genet. 24, 3472–3480. https://doi.org/10.1093/hmg/ddv098

Carpenter, D., Mitchell, L.M., Armour, J.A.L., 2017. Copy number variation of human AMY1 is a minor contributor to variation in salivary amylase expression and activity. Hum. Genomics 11. https://doi.org/10.1186/s40246-017-0097-3

*Chatterton, R.T., Vogelsong, K.M., Lu, Y.C., Ellman, A.B., Hudgens, G.A., 1996. Salivary alpha-amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. Clin. Physiol. Oxf. Engl. 16, 433–448. https://doi.org/10.1111/j.1475-097x.1996.tb00731.x

Choi, Y.-J., Nam, Y.-S., Yun, J.M., Park, J.H., Cho, B.L., Son, H.-Y., Kim, J.I., Yun, J.W., 2015. Association between salivary amylase (AMY1) gene copy numbers and insulin resistance in asymptomatic Korean men. Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc. 32, 1588–1595. https://doi.org/10.1111/dme.12808

Christensen, L., Hjorth, M.F., Krych, L., Licht, T.R., Lauritzen, L., Magkos, F., Roager, H.M., 2022. Prevotella abundance and salivary amylase gene copy number predict fat loss in response to wholegrain diets. Front. Nutr. 9. https://doi.org/10.3389/fnut.2022.947349

Cristiani, E., Radini, A., Zupancich, A., Gismondi, A., D'Agostino, A., Ottoni, C., Carra, M., Vukojičić, S., Constantinescu, M., Antonović, D., Price, T.D., Borić, D., 2021. Wild cereal grain consumption among Early Holocene foragers of the Balkans predates the arrival of agriculture. eLife 10. https://doi.org/10.7554/eLife.72976

*Dodds, M.W., Dodds, A.P., 1997. Effects of glycemic control on saliva flow rates and protein composition in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 83, 465–470. https://doi.org/10.1016/s1079-2104(97)90147-5

Eisfeldt, J., Nilsson, D., Andersson-Assarsson, J.C., Lindstrand, A., 2018. AMYCNE: Confident copy number assessment using whole genome sequencing data. PloS One 13, e0189710. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189710

Falchi, M., El-Sayed Moustafa, J.S., Takousis, P., Pesce, F., Bonnefond, A., Andersson-Assarsson, J.C., Sudmant, P.H., Dorajoo, R., Al-Shafai, M.N., Bottolo, L., Ozdemir, E., So, H.-C., Davies, R.W., Patrice, A., Dent, R., Mangino, M., Hysi, P.G., Dechaume, A., Huyvaert, M., Skinner, J., Pigeyre, M., Caiazzo, R., Raverdy, V., Vaillant, E., Field, S., Balkau, B., Marre, M., Visvikis-Siest, S., Weill, J., Poulain-Godefroy, O., Jacobson, P., Sjostrom, L., Hammond, C.J., Deloukas, P., Sham, P.C., McPherson, R., Lee, J., Tai, E.S., Sladek, R., Carlsson, L.M.S., Walley, A., Eichler, E.E., Pattou, F., Spector, T.D., Froguel, P., 2014. Low copy number of the salivary amylase gene predisposes to obesity. Nat. Genet. 46, 492–497. https://doi.org/10.1038/ng.2939

Farrell, M., Ramne, S., Gouinguenet, P., Brunkwall, L., Ericson, U., Raben, A., Nilsson, P.M., Orho-Melander, M., Granfeldt, Y., Tovar, J., Sonestedt, E., 2021. Effect of AMY1 copy number variation and various doses of starch intake on glucose homeostasis: data from a cross-sectional observational study and a crossover meal study. Genes Nutr. 16. https://doi.org/10.1186/s12263-021-00701-8

Fellows Yates, J.A., Velsko, I.M., Aron, F., Posth, C., Hofman, C.A., Austin, R.M., Parker, C.E., Mann, A.E., Nägele, K., Arthur, K.W., Arthur, J.W., Bauer, C.C., Crevecoeur, I., Cupillard, C., Curtis, M.C., Dalén, L., Díaz-Zorita Bonilla, M., Díez Fernández-Lomana, J.C., Drucker, D.G., Escribano Escrivá, E., Francken, M., Gibbon, V.E., González Morales, M.R., Grande Mateu, A., Harvati, K., Henry, A.G., Humphrey, L., Menéndez, M., Mihailović, D., Peresani, M., Rodríguez Moroder, S., Roksandic, M., Rougier, H., Sázelová, S., Stock, J.T., Straus, L.G., Svoboda, J., Teßmann, B., Walker, M.J., Power, R.C., Lewis, C.M., Sankaranarayanan, K., Guschanski, K., Wrangham, R.W., Dewhirst, F.E., Salazar-García, D.C., Krause, J., Herbig, A., Warinner, C., 2021. The evolution and changing ecology of the African hominid oral microbiome. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 118, e2021655118. https://doi.org/10.1073/pnas.2021655118

*Fernández, C.I., Wiley, A.S., 2017. Rethinking the starch digestion hypothesis for AMY1 copy number variation in humans. Am. J. Phys. Anthropol. 163, 645–657. https://doi.org/10.1002/ajpa.23237

Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004. CEREALS AND OTHER STARCH-BASED STAPLES: ARE CONSUMPTION PATTERNS CHANGING? Presented at the JOINT

MEETING OF THE INTERGOVERNMENTAL GROUP ON GRAINS AND THE INTERGOVERNMENTAL GROUP ON RICE, Rome.

*Glaser, C., Heinrich, J., Koletzko, B., 2010. Role of FADS1 and FADS2 polymorphisms in polyunsaturated fatty acid metabolism. Metabolism. 59, 993–999. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.10.022

Go, Y., Satta, Y., Takenaka, O., Takahata, N., 2005. Lineage-specific loss of function of bitter taste receptor genes in humans and nonhuman primates. Genetics 170, 313–326. https://doi.org/10.1534/genetics.104.037523

Granger, D.A., Kivlighan, K.T., el-Sheikh, M., Gordis, E.B., Stroud, L.R., 2007. Salivary alpha-amylase in biobehavioral research: recent developments and applications. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1098, 122–144. https://doi.org/10.1196/annals.1384.008

Green, R.E., Krause, J., Briggs, A.W., Maricic, T., Stenzel, U., Kircher, M., Patterson, N., Li, H., Zhai, W., Fritz, M.H.-Y., Hansen, N.F., Durand, E.Y., Malaspinas, A.-S., Jensen, J.D., Marques-Bonet, T., Alkan, C., Prüfer, K., Meyer, M., Burbano, H.A., Good, J.M., Schultz, R., Aximu-Petri, A., Butthof, A., Höber, B., Höffner, B., Siegemund, M., Weihmann, A., Nusbaum, C., Lander, E.S., Russ, C., Novod, N., Affourtit, J., Egholm, M., Verna, C., Rudan, P., Brajkovic, D., Kucan, Ž., Gušic, I., Doronichev, V.B., Golovanova, L.V., Lalueza-Fox, C., de la Rasilla, M., Fortea, J., Rosas, A., Schmitz, R.W., Johnson, P.L.F., Eichler, E.E., Falush, D., Birney, E., Mullikin, J.C., Slatkin, M., Nielsen, R., Kelso, J., Lachmann, M., Reich, D., Pääbo, S., 2010. A draft sequence of the Neandertal genome. Science 328, 710–722. https://doi.org/10.1126/science.1188021

Hamid, A.K., Andersson-Assarsson, J., Ericson, U., Sonestedt, E., 2020. Interaction Effect Between Copy Number Variation in Salivary Amylase Locus (AMY1) and Starch Intake on Glucose Homeostasis in the Malmö Diet and Cancer Cohort. Front. Nutr. 7. https://doi.org/10.3389/fnut.2020.598850

Hardy, K., Brand-Miller, J., Brown, K.D., Thomas, M.G., Copeland, L., 2015. THE IMPORTANCE OF DIETARY CARBOHYDRATE IN HUMAN EVOLUTION. Q. Rev. Biol. 90, 251–268. https://doi.org/10.1086/682587

Hasegawa, T., Kakuta, M., Yamaguchi, R., Sato, N., Mikami, T., Murashita, K., Nakaji, S., Itoh, K., Imoto, S., 2022. Impact of salivary and pancreatic amylase gene copy numbers on diabetes, obesity, and functional profiles of microbiome in Northern Japanese population. Sci. Rep. 12, 7628. https://doi.org/10.1038/s41598-022-11730-7

Heianza, Y., Sun, D., Wang, T., Huang, T., Bray, G.A., Sacks, F.M., Qi, L., 2017. Starch Digestion-Related Amylase Genetic Variant Affects 2-Year Changes in Adiposity in Response to Weight-Loss Diets: The POUNDS Lost Trial. Diabetes 66, 2416–2423. https://doi.org/10.2337/db16-1482

Heianza, Y., Zhou, T., Yuhang, C., Huang, T., Willett, W.C., Hu, F.B., Bray, G.A., Sacks, F.M., Qi, L., 2020. Starch Digestion-Related Amylase Genetic Variants, Diet, and Changes in Adiposity: Analyses in Prospective Cohort Studies and a Randomized Dietary Intervention. Diabetes 69, 1917–1926. https://doi.org/10.2337/db19-1257

Higuchi, R., Iwane, T., Iida, A., Nakajima, K., 2020. Copy Number Variation of the Salivary Amylase Gene and Glucose Metabolism in Healthy Young Japanese Women. J. Clin. Med. Res. 12, 184–189. https://doi.org/10.14740/jocmr4082

Hjorth, M.F., Christensen, L., Larsen, T.M., Roager, H.M., Krych, L., Kot, W., Nielsen, D.S., Ritz, C., Astrup, A., 2020. Pretreatment Prevotella-to-Bacteroides ratio and salivary amylase gene copy number as prognostic markers for dietary weight loss. Am. J. Clin. Nutr. 111, 1079–1086. https://doi.org/10.1093/ajcn/nqaa007

Inchley, C.E., Larbey, C.D.A., Shwan, N.A.A., Pagani, L., Saag, L., Antão, T., Jacobs, G., Hudjashov, G., Metspalu, E., Mitt, M., Eichstaedt, C.A., Malyarchuk, B., Derenko, M., Wee, J., Abdullah, S., Ricaut, F.-X., Mormina, M., Mägi, R., Villems, R., Metspalu, M., Jones, M.K., Armour, J.A.L., Kivisild, T., 2016. Selective sweep on human amylase genes postdates the split with Neanderthals. Sci. Rep. 6. https://doi.org/10.1038/srep37198

*Ingram, C.J.E., Mulcare, C.A., Itan, Y., Thomas, M.G., Swallow, D.M., 2009. Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence. Hum. Genet. 124, 579–591. https://doi.org/10.1007/s00439-008-0593-6

Itan, Y., Powell, A., Beaumont, M.A., Burger, J., Thomas, M.G., 2009. The origins of lactase persistence in Europe. PLoS Comput. Biol. 5, e1000491. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000491

Jakubowicz, D., Wainstein, J., Tsameret, S., Landau, Z., 2021. Role of High Energy Breakfast "Big Breakfast Diet" in Clock Gene Regulation of Postprandial Hyperglycemia and Weight Loss in Type 2 Diabetes. Nutrients 13. https://doi.org/10.3390/nu13051558

Kheirmand Parizi, Marjan, Akbari, H., Malek-Mohamadi, M., Kheirmand Parizi, Maryam, Kakoei, S., 2019. Association of salivary levels of immunoglobulin-a and amylase with oral-dental manifestations in patients with controlled and non-controlled type 2 diabetes. BMC Oral Health 19. https://doi.org/10.1186/s12903-019-0868-4

*Kivlighan, K.T., Granger, D.A., 2006. Salivary alpha-amylase response to competition: relation to gender, previous experience, and attitudes. Psychoneuroendocrinology 31, 703–714. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2006.01.007

Langergraber, K.E., Prüfer, K., Rowney, C., Boesch, C., Crockford, C., Fawcett, K., Inoue, E., Inoue-Muruyama, M., Mitani, J.C., Muller, M.N., Robbins, M.M., Schubert, G., Stoinski, T.S., Viola, B., Watts, D., Wittig, R.M., Wrangham, R.W., Zuberbühler, K., Pääbo, S., Vigilant, L., 2012. Generation times in wild chimpanzees and gorillas suggest earlier divergence times in great ape and human evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109, 15716–15721. https://doi.org/10.1073/pnas.1211740109

Laxova, R., 1972. Antenatal development of amylase isoenzymes. J. Med. Genet. 9, 321–323. https://doi.org/10.1136/jmg.9.3.321

Lazaridis, I., Patterson, N., Mittnik, A., Renaud, G., Mallick, S., Kirsanow, K., Sudmant, P.H., Schraiber, J.G., Castellano, S., Lipson, M., Berger, B., Economou, C., Bollongino, R., Fu, Q., Bos, K.I., Nordenfelt, S., Li, H., de Filippo, C., Prüfer, K., Sawyer, S., Posth, C., Haak, W., Hallgren, F., Fornander, E., Rohland, N., Delsate, D., Francken, M., Guinet, J.-M., Wahl, J., Ayodo, G., Babiker, H.A., Bailliet, G., Balanovska, E., Balanovsky, O., Barrantes, R., Bedoya, G., Ben-Ami, H., Bene, J., Berrada, F., Bravi, C.M., Brisighelli, F., Busby, G.B.J., Cali, F., Churnosov, M., Cole, D.E.C., Corach, D., Damba, L., van Driem, G., Dryomov, S., Dugoujon, J.-M., Fedorova, S.A., Gallego Romero, I., Gubina, M., Hammer, M., Henn, B.M., Hervig, T., Hodoglugil, U., Jha, A.R., Karachanak-Yankova, S., Khusainova, R., Khusnutdinova, E., Kittles, R., Kivisild, T., Klitz, W., Kučinskas, V., Kushniarevich, A., Laredj, L., Litvinov, S., Loukidis, T., Mahley, R.W., Melegh, B., Metspalu, E., Molina, J., Mountain, J., Näkkäläjärvi, K., Nesheva, D., Nyambo, T., Osipova, L., Parik, J., Platonov, F., Posukh, O., Romano, V., Rothhammer, F., Rudan, I., Ruizbakiev, R., Sahakyan, H., Sajantila, A., Salas, A., Starikovskaya, E.B., Tarekegn, A., Toncheva, D., Turdikulova, S., Uktveryte, I., Utevska, O., Vasquez, R., Villena, M., Voevoda, M., Winkler, C.A., Yepiskoposyan, L., Zalloua, P., Zemunik, T., Cooper, A., Capelli, C., Thomas, M.G., Ruiz-Linares, A., Tishkoff, S.A., Singh, L., Thangaraj, K., Villems, R., Comas, D., Sukernik, R., Metspalu, M., Meyer, M., Eichler, E.E., Burger, J., Slatkin, M., Pääbo, S., Kelso, J., Reich, D., Krause, J., 2014. Ancient human genomes suggest three ancestral populations for present-day Europeans. Nature 513, 409–413. https://doi.org/10.1038/nature13673

León-Mimila, P., Villamil-Ramírez, H., López-Contreras, B.E., Morán-Ramos, S., Macias-Kauffer, L.R., Acuña-Alonzo, V., Del Río-Navarro, B.E., Salmerón, J., Velazquez-Cruz, R., Villarreal-Molina, T., Aguilar-Salinas, C.A., Canizales-Quinteros, S., 2018. Low Salivary Amylase Gene (AMY1) Copy Number Is Associated with Obesity and Gut Prevotella Abundance in Mexican Children and Adults. Nutrients 10, 1607. https://doi.org/10.3390/nu10111607

Li, H., Borné, Y., Wang, Y., Sonestedt, E., 2023. Starch intake, amylase gene copy number variation, plasma proteins, and risk of cardiovascular disease and mortality. BMC Med. 21. https://doi.org/10.1186/s12916-022-02706-5

Liu, Y., Smith, C.E., Parnell, L.D., Lee, Y.-C., An, P., Straka, R.J., Tiwari, H.K., Wood, A.C., Kabagambe, E.K., Hidalgo, B., Hopkins, P.N., Province, M.A., Arnett, D.K., Tucker, K.L., Ordovas, J.M., Lai, C.-Q., 2020. Salivary AMY1 Copy Number Variation Modifies Age-Related Type 2 Diabetes Risk. Clin. Chem. 66, 718–726. https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa072

Locia-Morales, D., Vázquez-Moreno, M., González-Dzib, R., Domínguez-Hernández, C., Pérez-Herrera, A., Robles-Ramírez, R.J., Rocha-Cruz, A., Meyre, D., Flores-Alfaro, E., Cruz, M., 2022. Association of total and pancreatic serum amylase enzymatic activity with insulin

resistance and the glucose and insulin responses to oral starch test in Mexican children. Pediatr. Obes. 17, e12965. https://doi.org/10.1111/ijpo.12965
Luca, F., Perry, G.H., Di Rienzo, A., 2010. Evolutionary Adaptations to Dietary Changes. Annu. Rev. Nutr. 30, 291–314. https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-080508-141048
Lv, Y., Liu, R., Jia, H., Sun, X., Gong, Y., Ma, L., Qiu, W., Wang, X., 2023. Alterations of the gut microbiota in type 2 diabetics with or without subclinical hypothyroidism. PeerJ 11, e15193. https://doi.org/10.7717/peerj.15193
Mandel, A.L., Breslin, P.A.S., 2012. High endogenous salivary amylase activity is associated with improved glycemic homeostasis following starch ingestion in adults. J. Nutr. 142, 853–858. https://doi.org/10.3945/jn.111.156984
Mandel, A.L., Peyrot des Gachons, C., Plank, K.L., Alarcon, S., Breslin, P.A.S., 2010. Individual differences in AMY1 gene copy number, salivary α-amylase levels, and the perception of oral starch. PloS One 5, e13352. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013352
Marcovecchio, M.L., Florio, R., Verginelli, F., De Lellis, L., Capelli, C., Verzilli, D., Chiarelli, F., Mohn, A., Cama, A., 2016. Low AMY1 Gene Copy Number Is Associated with Increased Body Mass Index in Prepubertal Boys. PloS One 11, e0154961. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154961
Marquina, C., Mousa, A., Belski, R., Banaharis, H., Naderpoor, N., de Courten, B., 2019. Increased Inflammation and Cardiometabolic Risk in Individuals with Low AMY1 Copy Numbers. J. Clin. Med. 8, 382. https://doi.org/10.3390/jcm8030382
Mathias, R.A., Fu, W., Akey, J.M., Ainsworth, H.C., Torgerson, D.G., Ruczinski, I., Sergeant, S., Barnes, K.C., Chilton, F.H., 2012. Adaptive evolution of the FADS gene cluster within Africa. PloS One 7, e44926. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044926
Mathieson, S., Mathieson, I., 2018. FADS1 and the Timing of Human Adaptation to Agriculture. Mol. Biol. Evol. 35, 2957–2970. https://doi.org/10.1093/molbev/msy180
Mejía-Benítez, M.A., Bonnefond, A., Yengo, L., Huyvaert, M., Dechaume, A., Peralta-Romero, J., Klünder-Klünder, M., García Mena, J., El-Sayed Moustafa, J.S., Falchi, M., Cruz, M., Froguel, P., 2015. Beneficial effect of a high number of copies of salivary amylase AMY1 gene on obesity risk in Mexican children. Diabetologia 58, 290–294. https://doi.org/10.1007/s00125-014-3441-3
Merritt, A.D., Rivas, M.L., Bixler, D., Newell, R., 1973. Salivary and pancreatic amylase: electrophoretic characterizations and genetic studies. Am. J. Hum. Genet. 25, 510–522.
Nakajima, K., Nemoto, T., Muneyuki, T., Kakei, M., Fuchigami, H., Munakata, H., 2011. Low serum amylase in association with metabolic syndrome and diabetes: A community-based study. Cardiovasc. Diabetol. 10. https://doi.org/10.1186/1475-2840-10-34
Ooi, D.S.Q., Tan, V.M.H., Ong, S.G., Chan, Y.H., Heng, C.K., Lee, Y.S., 2017. Differences in AMY1 Gene Copy Numbers Derived from Blood, Buccal Cells and Saliva Using Quantitative and Droplet Digital PCR Methods: Flagging the Pitfall. PloS One 12, e0170767. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170767
Pajic, P., Pavlidis, P., Dean, K., Neznanova, L., Romano, R.-A., Garneau, D., Daugherity, E., Globig, A., Ruhl, S., Gokcumen, O., 2019. Independent amylase gene copy number bursts correlate with dietary preferences in mammals. eLife 8, e44628. https://doi.org/10.7554/eLife.44628
Park, S.Y., Gautier, J.-F., Chon, S., 2021. Assessment of Insulin Secretion and Insulin Resistance in Human. Diabetes Metab. J. 45, 641–654. https://doi.org/10.4093/dmj.2021.0220
Patin, E., Barreiro, L.B., Sabeti, P.C., Austerlitz, F., Luca, F., Sajantila, A., Behar, D.M., Semino, O., Sakuntabhai, A., Guiso, N., Gicquel, B., McElreavey, K., Harding, R.M., Heyer, E., Quintana-Murci, L., 2006. Deciphering the ancient and complex evolutionary history of human arylamine N-acetyltransferase genes. Am. J. Hum. Genet. 78, 423–436. https://doi.org/10.1086/500614
Pedersen, A.M., Bardow, A., Jensen, S.B., Nauntofte, B., 2002. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. Oral Dis. 8, 117–129. https://doi.org/10.1034/j.1601-0825.2002.02851.x
Perry, G.H., Dominy, N.J., Claw, K.G., Lee, A.S., Fiegler, H., Redon, R., Werner, J., Villanea, F.A., Mountain, J.L., Misra, R., Carter, N.P., Lee, C., Stone, A.C., 2007. Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. Nat. Genet. 39, 1256–1260. https://doi.org/10.1038/ng2123

Perry, G.H., Kistler, L., Kelaita, M.A., Sams, A.J., 2015. Insights into hominin phenotypic and dietary evolution from ancient DNA sequence data. J. Hum. Evol. 79, 55–63. https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2014.10.018

Peyrot des Gachons, C., Breslin, P.A.S., 2016. Salivary Amylase: Digestion and Metabolic Syndrome. Curr. Diab. Rep. 16. https://doi.org/10.1007/s11892-016-0794-7

Poole, A.C., Goodrich, J.K., Youngblut, N.D., Luque, G.G., Ruaud, A., Sutter, J.L., Waters, J.L., Shi, Q., El-Hadidi, M., Johnson, L.M., Bar, H.Y., Huson, D.H., Booth, J.G., Ley, R.E., 2019. Human Salivary Amylase Gene Copy Number Impacts Oral and Gut Microbiomes. Cell Host Microbe 25, 553-564.e7. https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.03.001

Pös, O., Radvanszky, J., Buglyó, G., Pös, Z., Rusnakova, D., Nagy, B., Szemes, T., 2021. DNA copy number variation: Main characteristics, evolutionary significance, and pathological aspects. Biomed. J. 44, 548–559. https://doi.org/10.1016/j.bj.2021.02.003

Prathibha, K.M., Johnson, P., Ganesh, M., Subhashini, A.S., 2013. Evaluation of Salivary Profile among Adult Type 2 Diabetes Mellitus Patients in South India. J. Clin. Diagn. Res. JCDR 7, 1592–1595. https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/5749.3232

Pruimboom, L., Fox, T., Muskiet, F.A.J., 2014. Lactase persistence and augmented salivary alpha-amylase gene copy numbers might have been selected by the combined toxic effects of gluten and (food born) pathogens. Med. Hypotheses 82, 326–334. https://doi.org/10.1016/j.mehy.2013.12.020

*Räikkönen, K., Matthews, K.A., Pesonen, A.-K., Pyhälä, R., Paavonen, E.J., Feldt, K., Jones, A., Phillips, D.I.W., Seckl, J.R., Heinonen, K., Lahti, J., Komsi, N., Järvenpää, A.-L., Eriksson, J.G., Strandberg, T.E., Kajantie, E., 2010. Poor sleep and altered hypothalamic-pituitary-adrenocortical and sympatho-adrenal-medullary system activity in children. J. Clin. Endocrinol. Metab. 95, 2254–2261. https://doi.org/10.1210/jc.2009-0943

Rossi, N., Aliyev, E., Visconti, A., Akil, A.S.A., Syed, N., Aamer, W., Padmajeya, S.S., Falchi, M., Fakhro, K.A., 2021. Ethnic-specific association of amylase gene copy number with adiposity traits in a large Middle Eastern biobank. NPJ Genomic Med. 6. https://doi.org/10.1038/s41525-021-00170-3

Rukh, G., Ericson, U., Andersson-Assarsson, J., Orho-Melander, M., Sonestedt, E., 2017. Dietary starch intake modifies the relation between copy number variation in the salivary amylase gene and BMI. Am. J. Clin. Nutr. 106, 256–262. https://doi.org/10.3945/ajcn.116.149831

Sabbagh, A., Darlu, P., Crouau-Roy, B., Poloni, E.S., 2011. Arylamine N-acetyltransferase 2 (NAT2) genetic diversity and traditional subsistence: a worldwide population survey. PloS One 6, e18507. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018507

Samuelson, L.C., Phillips, R.S., Swanberg, L.J., 1996. Amylase gene structures in primates: retroposon insertions and promoter evolution. Mol. Biol. Evol. 13, 767–779. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025637

Samuelson, L.C., Wiebauer, K., Snow, C.M., Meisler, M.H., 1990. Retroviral and pseudogene insertion sites reveal the lineage of human salivary and pancreatic amylase genes from a single gene during primate evolution. Mol. Cell. Biol. 10, 2513–2520. https://doi.org/10.1128/mcb.10.6.2513-2520.1990

Santos, J.L., Saus, E., Smalley, S.V., Cataldo, L.R., Alberti, G., Parada, J., Gratacòs, M., Estivill, X., 2012. Copy number polymorphism of the salivary amylase gene: implications in human nutrition research. J. Nutr. Nutr. 5, 117–131. https://doi.org/10.1159/000339951

*Scrimshaw, N.S., Murray, E.B., 1988. The acceptability of milk and milk products in populations with a high prevalence of lactose intolerance. Am. J. Clin. Nutr. 48, 1079–1159. https://doi.org/10.1093/ajcn/48.4.1142

Selvaraju, V., Venkatapoorna, C.M.K., Babu, J.R., Geetha, T., 2020. Salivary Amylase Gene Copy Number Is Associated with the Obesity and Inflammatory Markers in Children. Diabetes Metab. Syndr. Obes. Targets Ther. 13, 1695–1701. https://doi.org/10.2147/DMSO.S251359

Shin, D., Lee, K.W., 2021. Dietary carbohydrates interact with AMY1 polymorphisms to influence the incidence of type 2 diabetes in Korean adults. Sci. Rep. 11. https://doi.org/10.1038/s41598-021-96257-z

*Skrha, J., Stěpán, J., 1987. Clinical significance of amylase isoenzyme determination. Acta Univ. Carol. Med. Monogr. 120, 1–81.

Squires, B.T., 1953. Human salivary amylase secretion in relation to diet. J. Physiol. 119, 153–156. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1953.sp004835

Stedman, H.H., Kozyak, B.W., Nelson, A., Thesier, D.M., Su, L.T., Low, D.W., Bridges, C.R., Shrager, J.B., Minugh-Purvis, N., Mitchell, M.A., 2004. Myosin gene mutation correlates with anatomical changes in the human lineage. Nature 428, 415–418. https://doi.org/10.1038/nature02358

Swallow, D.M., 2003. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. Annu. Rev. Genet. 37, 197–219. https://doi.org/10.1146/annurev.genet.37.110801.143820

Tan, V.M.H., Ooi, D.S.Q., Kapur, J., Wu, T., Chan, Y.H., Henry, C.J., Lee, Y.S., 2016. The role of digestive factors in determining glycemic response in a multiethnic Asian population. Eur. J. Nutr. 55, 1573–1581. https://doi.org/10.1007/s00394-015-0976-0

Ting, C.N., Rosenberg, M.P., Snow, C.M., Samuelson, L.C., Meisler, M.H., 1992. Endogenous retroviral sequences are required for tissue-specific expression of a human salivary amylase gene. Genes Dev. 6, 1457–1465. https://doi.org/10.1101/gad.6.8.1457

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., Ibrahim, M., Omar, S.A., Lema, G., Nyambo, T.B., Ghori, J., Bumpstead, S., Pritchard, J.K., Wray, G.A., Deloukas, P., 2007. Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. Nat. Genet. 39, 31–40. https://doi.org/10.1038/ng1946

Tucci, S.A., Boyland, E.J., Halford, J.C., 2010. The role of lipid and carbohydrate digestive enzyme inhibitors in the management of obesity: a review of current and emerging therapeutic agents. Diabetes Metab. Syndr. Obes. Targets Ther. 3, 125–143. https://doi.org/10.2147/dmsott.s7005

Tye, J.G., Karn, R.C., Merritt, A.D., 1976. Differential expression of salivary (Amy1) and pancreatic (Amy2) human amylase loci in prenatal and postnatal development. J. Med. Genet. 13, 96–102. https://doi.org/10.1136/jmg.13.2.96

Usher, C.L., Handsaker, R.E., Esko, T., Tuke, M.A., Weedon, M.N., Hastie, A.R., Cao, H., Moon, J.E., Kashin, S., Fuchsberger, C., Metspalu, A., Pato, C.N., Pato, M.T., McCarthy, M.I., Boehnke, M., Altshuler, D.M., Frayling, T.M., Hirschhorn, J.N., McCarroll, S.A., 2015. Structural forms of the human amylase locus and their relationships to SNPs, haplotypes and obesity. Nat. Genet. 47, 921–925. https://doi.org/10.1038/ng.3340

Valsesia, A., Kulkarni, S.S., Marquis, J., Leone, P., Mironova, P., Walter, O., Hjorth, M.F., Descombes, P., Hager, J., Saris, W.H., Astrup, A., Darimont, C., O'Callaghan, N.J., 2019. Salivary α-amylase copy number is not associated with weight trajectories and glycemic improvements following clinical weight loss: results from a 2-phase dietary intervention study. Am. J. Clin. Nutr. 109, 1029–1037. https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy363

Van Lenten, S.A., Doane, L.D., 2016. Examining multiple sleep behaviors and diurnal salivary cortisol and alpha-amylase: Within- and between-person associations. Psychoneuroendocrinology 68, 100–110. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.02.017

Vangenot, C., Gagneux, P., de Groot, N.G., Baumeyer, A., Mouterde, M., Crouau-Roy, B., Darlu, P., Sanchez-Mazas, A., Sabbagh, A., Poloni, E.S., 2019. Humans and Chimpanzees Display Opposite Patterns of Diversity in Arylamine N-Acetyltransferase Genes. G3 Bethesda Md 9, 2199–2224. https://doi.org/10.1534/g3.119.400223

Venkatapoorna, C.M.K., Ayine, P., Parra, E.P., Koenigs, T., Phillips, M., Babu, J.R., Sandey, M., Geetha, T., 2019. Association of Salivary Amylase (AMY1) Gene Copy Number with Obesity in Alabama Elementary School Children. Nutrients 11. https://doi.org/10.3390/nu11061379

Viljakainen, H., Andersson-Assarsson, J.C., Armenio, M., Pekkinen, M., Pettersson, M., Valta, H., Lipsanen-Nyman, M., Mäkitie, O., Lindstrand, A., 2015. Low Copy Number of the AMY1 Locus Is Associated with Early-Onset Female Obesity in Finland. PloS One 10, e0131883. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131883

Wilson, G.M., Flibotte, S., Missirlis, P.I., Marra, M.A., Jones, S., Thornton, K., Clark, A.G., Holt, R.A., 2006. Identification by full-coverage array CGH of human DNA copy number increases relative to chimpanzee and gorilla. Genome Res. 16, 173–181. https://doi.org/10.1101/gr.4456006

Wolever, T.M.S., El-Sohemy, A., Ezatagha, A., Zurbau, A., Jenkins, A.L., 2021. Neither low salivary amylase activity, cooling cooked white rice, nor single nucleotide polymorphisms in starch-

digesting enzymes reduce glycemic index or starch digestibility: a randomized, crossover trial in healthy adults. Am. J. Clin. Nutr. 114, 1633–1645. https://doi.org/10.1093/ajcn/nqab228

Wrangham, R., Conklin-Brittain, N., 2003. “Cooking as a biological trait.” Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 136, 35–46. https://doi.org/10.1016/s1095-6433(03)00020-5

*Wrangham, R.W., Jones, J.H., Laden, G., Pilbeam, D., Conklin-Brittain, N., 1999. The Raw and the Stolen. Cooking and the Ecology of Human Origins. Curr. Anthropol. 40, 567–594.

Yang, Z.-M., Chen, L.-H., Zhang, M., Lin, J., Zhang, J., Chen, W.-W., Yang, X.-R., 2015a. Age Differences of Salivary Alpha-Amylase Levels of Basal and Acute Responses to Citric Acid Stimulation Between Chinese Children and Adults. Front. Physiol. 6. https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00340

Yang, Z.-M., Lin, J., Chen, L.-H., Zhang, M., Chen, W.-W., Yang, X.-R., 2015b. The roles of AMY1 copies and protein expression in human salivary α-amylase activity. Physiol. Behav. 138, 173–178. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.10.037

Yavuzyilmaz, E., Yumak, O., Akdoğanli, T., Yamalik, N., Ozer, N., Ersoy, F., Yeniay, I., 1996. The alterations of whole saliva constituents in patients with diabetes mellitus. Aust. Dent. J. 41, 193–197. https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.1996.tb04855.x

Yilmaz, F., Karageorgiou, C., Kim, K., Pajic, P., Beck, C.R., Human Genome Structural Variation Consortium, Torregrossa, A.-M., Lee, C., Gokcumen, O., 2023. Ancient AMY1 gene duplications primed the amylase locus for adaptive evolution upon the onset of agriculture. BioRxiv Prepr. Serv. Biol. https://doi.org/10.1101/2023.11.27.568916

Zhan, F., Chen, J., Yan, H., Wang, S., Zhao, M., Zhang, S., Lan, X., Maekawa, M., 2021. Association of Serum Amylase Activity and the Copy Number Variation of AMY1/2A/2B with Metabolic Syndrome in Chinese Adults. Diabetes Metab. Syndr. Obes. Targets Ther. 14, 4705–4714. https://doi.org/10.2147/DMSO.S339604

Zhang, X., Moran, C., Wang, R., Zhou, Y., 2023. Effect of Aerobic Exercise in Chinese Adult Individuals at Risk for Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) with Low Salivary Amylase Gene (AMY1) Copy Number Variation. Diabetes Metab. Syndr. Obes. Targets Ther. 16, 2875–2883. https://doi.org/10.2147/DMSO.S409007

Zhao, Y., Zhang, Jie, Zhang, Juanwen, Wu, J., Chen, Y., 2014. Metabolic syndrome and diabetes are associated with low serum amylase in a Chinese asymptomatic population. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 74, 235–239. https://doi.org/10.3109/00365513.2013.878469