

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Antropologie a genetika člověka
Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



Mgr. Edita Priehodová

Koevoluční aspekty genetické diverzity:
mléčná produkce a laktázová persistence

Co-evolutionary aspects of genetic diversity:
milk production and lactase persistence

Disertační práce

Školitel: doc. Mgr. Viktor Černý, Dr.

Praha, 2017

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, 31. 1. 2017

Podpis

Poděkování:

Můj velký dík patří Viktorovi Černému za vedení během celého doktorského studia, kde mi bylo umožněno věnovat se práci na velmi zajímavých projektech a spolupracovat se zahraničními kolegy, což považuji za nesmírně obohacující. Rovněž děkuji za cenné rady, připomínky a korekce týkající se vlastního rukopisu.

Poděkování náleží rovněž kolegům z Musée de l'Homme v Paříži, Evelyne Heyerové za umožnění stáže v tamní laboratoři a pomoc s navržením části studie, Sophii Lafosseové a Phillipu Endicottovi za cenné rady a pomoc s laboratorním zpracováním a Fredericovi Austerlitzovi za pomoc s částí výpočtů a trpělivé odpovědi na mé otázky.

Díky si zaslouží i tým Laboratoře archeogenetiky Eliška Podgorná, Jana Nováčková, Martina Čížková a Iva Kulichová, za ochotu kdykoli poradit a hlavně díky za skvělou atmosféru na pracovišti.

Děkuji Davidu Vinklerovi z Katedry zoologie PřF UK za pomoc s prvními krůčky při metodě analýz křivek tání s vysokým rozlišením. Můj velký dík patří rovněž Estelle Poloniové z Ženevské univerzity za velkou ochotu vždy poradit s výpočetními metodami i dalšími aspekty mé práce.

Děkuji své rodině za podporu během celého studia, bez ní by bylo mnohem obtížnější, a děkuji Ondřejovi, mimo jiné za motivaci ve chvílích, kdy vše nešlo, tak jak mělo.

Výzkum laktázové persistence byl podpořen Grantovou agenturou Univerzity Karlovy 651112 a Grantovou agenturou České republiky 13-37998S-P505.

Abstrakt

Laktázovou persistencí (LP) nazýváme geneticky podmíněnou schopnost trávit laktózu (mléčný cukr) v dospělosti. Laktóza je štěpena enzymem tenkého střeva – laktázou, jehož produkce u savců po odstavení ustává. V případě LP je laktáza produkována po celý život, čímž je umožněno bez obtíží přijímat větší množství čerstvého mléka. LP je doložena jen u některých lidských populací. Celosvětově je její rozšíření nerovnoměrné, nejčastější je v severní Evropě a u pastevců aridních oblastí Afriky a Arábie. LP souvisí se vznikem zemědělství před 10 000 lety a počátky mléčné produkce. V určitých populacích nacházíme signál silné pozitivní selekce pro LP, zřejmě podmíněnou různými faktory v závislosti na různých životních podmínkách. LP způsobují jednobodové polymorfismy nacházející se zhruba 14 kb *upstream* od laktázového genu. Dnes je známo pět různých pro-LP variant, které vznikly a rozšířily se zcela nezávisle.

Jedním z možných center vzniku LP je Arabský poloostrov, kde se poprvé objevila a rozšířila pro-LP varianta –13915*G. V této práci bylo studováno rozšíření pro-LP mutací u populací jižní Arábie a afrických Arabů. U všech analyzovaných souborů byl potvrzen výskyt –13915*G. V jižní Arábii pak u většiny souborů ve frekvenci vyšší než 50 %. U afrických Arabů patřících k pastevcům velbloudů byl zaznamenán vyšší výskyt této mutace (44,4–76 %) oproti africkým Arabům, jež přešli k chovu hovězího dobytka či usedlému zemědělství (1,4–25,5 %). Výsledky podporují hypotézu předchozích studií, že –13915*G vznikla a prvně se rozšířila v Arábii pravděpodobně v souvislosti s domestikací velblouda. Výsledky odhadu stáří a expanze pak ukazují, že –13915*G se z Arábie do Afriky rozšířila migracemi probíhajícími od 7. století našeho letopočtu.

Abstract

Lactase persistence (LP) is genetically determined ability to digest lactose (milk sugar) in adulthood. Lactose is digested by the intestinal enzyme – lactase. In mammals, production of lactase declines after the weaning period. In case of the LP, the lactase is produced during whole life and thus it is possible to drink larger amounts of fresh milk without digestive problems. However, LP is documented only in some human populations. Its worldwide distribution is unequal, the highest rates are found in northern Europe and in pastoralists living in arid regions of Africa and Arabia. The origin of this trait is related to the emergence of agriculture 10,000 years ago, and the beginnings of milk production. In some populations, there is a strong signal of positive selection for the LP caused by various factors depending on various living conditions. The LP is associated with single nucleotide polymorphisms (SNPs) located approximately 14 kb upstream from lactase gene. Nowadays we know five different SNPs which cause the LP and they have probably different origin and have expanded independently.

One of the possible centres of the LP origin is the Arabian Peninsula, where the LP variant –13,915*G probably first appeared and spread. In this thesis, occurrences of different LP mutations were investigated in the populations of southern Arabia and African Arabs. In all analysed datasets, the presence of the –13,915*G has been confirmed. The frequency of the –13,915*G in southern Arabia was higher than 50% in most of analysed datasets. Higher incidence of this mutation (44.5–76%) was recorded in the African Arabs who raise camels, compared to the African Arabs, who switched to the cattle farming or sedentary agriculture (1.4 to 25.5%). The results support the hypothesis formed in previous studies suggesting that the –13,915*G was at first spread in Arabia probably in connection of the camel domestication. The estimating of the age and expansion of the –13,915*G is consistent with the migrations from Arabia to Africa which started in the 7th century AD.

Obsah

1	Úvod	9
2	Laktázová persistence – přehled současných znalostí	11
2.1	Mléko a jeho složení	11
2.2	Trávení laktózy	12
2.3	Laktázová persistence	16
2.3.1	Genetické principy laktázové persistence.....	16
2.3.2	Měření fenotypu laktázové persistence	21
2.4	Rozšíření LP v dnešním světě.....	23
2.4.1	LP v Evropě	24
2.4.2	LP v Asii a u původních obyvatel Austrálie a Ameriky.....	25
2.4.3	LP v Africe	27
2.5	Historicko-kulturní kontext.....	30
2.5.1	Neolit a počátky mléčného hospodářství.....	30
2.5.2	Pastevectví jako adaptace na aridní klima.....	33
2.6	Molekulární signály pozitivní selekce pro laktázovou persistenci	35
2.7	Hypotézy vzniku a rozšíření laktázové persistence	40
2.7.1	Kulturně-historická hypotéza	41
2.7.2	Hypotéza zvýšení příjmu vápníku v oblastech s nedostatkem slunečního záření.....	42
2.7.3	Hypotéza o LP v aridních oblastech.....	45
2.8	Šíření laktázové persistence v Evropě a výzkum aDNA	46
3	Vlastní práce a výsledky: laktázová persistence v Arábii a u afrických Arabů	49
3.1	Historické pozadí	49
3.1.1	Jižní Arábie od neolitu po rozpad karavanních království	49
3.1.2	Migrace z Arábie do Afriky.....	51

3.2	Cíle práce	53
3.3	Materiál.....	54
3.4	Metody	56
3.4.1	Izolace DNA	56
3.4.2	Určení pro-LP variant.....	56
3.4.3	Získání genotypů pro odhad věku expanze mutace –13915*G.....	57
3.4.4	Vysokorozlišovací analýza křivek tání.....	59
3.5	Vyhodnocení dat	63
3.5.1	Intra-populační vyhodnocení výskytu pro-LP mutací.....	63
3.5.2	Inter-populační srovnání.....	63
3.5.3	Odhad doby expanze mutace -13195*G.....	63
3.6	Výsledky	65
3.6.1	Intra-populační variabilita	65
3.6.2	Výskyt mutace –13915*G	66
3.6.3	Výskyt mutace –13910*T.....	67
3.6.4	Výskyt mutace –14009*G	71
3.6.5	AMOVA.....	71
3.6.6	PCoA	72
3.6.7	Odhad doby expanze mutace –13915*G.....	76
3.7	Diskuze	82
3.7.1	Diverzita pro-LP mutací v Arábii a u afrických Arabů.....	82
3.7.2	Odhad doby expanze mutace –13915*G.....	91
4	Závěr.....	96
	Seznam použitých zkratk	99
	Použitá literatura.....	101
	Seznam tabulek.....	114

Seznam obrázků.....	115
Přílohy	117
P1 Protokol odběru bukálního stěru a izolace DNA z bukálních stěrů přes kolonky QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)	117
Odběr bukálního stěru	117
Izolace DNA.....	117
P2 Readme.....	119
P3 Populace pro obrázek 21	121

1 Úvod

Ačkoli se vědci, lékaři a výživoví experti stále nedokážou shodnout na tom, zda je pití mléka prospěšné i po uplynutí kojeneckého období, konzumace mléka a mléčných výrobků má velmi dlouhou tradici sahající až k počátkům zemědělství. Navíc v důsledku pití čerstvého mléka v určitých populacích či kulturách vznikla a postupně se rozšířila u savců pravděpodobně unikátní schopnost trávit mléčný cukr (laktózu) i v dospělém věku.

Savci po odstavení přestávají produkovat enzym tenkého střeva laktázu a konzumace mléka v dospělosti může působit trávicí obtíže. U lidských populací, jejichž kultura byla a případně stále je spojena s chovem zvířat a mléčnou produkcí, nacházíme tzv. laktázovou persistenci. Jedná se o geneticky podmíněnou schopnost produkovat laktázu nejen v kojeneckém období, ale po celý život a díky tomu přijímat bez obtíží větší množství čerstvého mléka, v němž jsou kromě cukru a proteinů obsaženy také důležité vitamíny a minerály. V mléčných výrobcích, jež prošly fermentací, je obsah laktózy snížen a jsou díky tomu dobře stravitelné i pro osoby, jež laktázu neprodukují. Problematika má i výrazně ekologický dosah – pastevectví, a s ním spjatá konzumace čerstvého mléka domácích zvířat, umožňuje člověku využívat na potravní zdroje chudé prostředí.

Laktázová persistence není u lidských populací rozmístěna rovnoměrně, existují místa, kde se nevyskytuje vůbec a naopak lokality, kde je rozšířena u většiny populace. Tento fakt se stal předmětem ohromného množství vědeckých studií, jež se snaží zjistit příčiny, které působily na rozšíření tohoto unikátního jevu. Laktázová persistence je totiž také jedinečným příkladem toho, jak se kulturní zvyklosti mohou odrazit v lidském genomu a jeho nedávné evoluci.

V první části této práce, *Přehledu současných znalostí*, jsou nejprve shrnuty hlavní poznatky o laktázové persistenci z různých úhlů pohledu, je zde zmíněno složení mléka coby zdroje živin, fyziologie trávení laktózy, genetická podstata laktázové persistence a její dnešní rozšíření. Druhá polovina *Přehledu* se zabývá teoriemi o příčinách nerovnoměrného rozšíření laktázové persistence v dnešním světě podpořených demografickými, genetickými ale i archeologickými studiemi.

Sama výzkumná část této disertační práce vychází ze dvou článků, jež se týkají laktázové persistence v Arábii a u afrických Arabů (Priehodová et al. 2014; Priehodová

et al. 2017). Další výzkumy, zde prezentované jen částečně, jsou doposud nepublikované.

Hlavním cílem bylo zmapovat výskyt mutací zodpovědných za laktázou persistenci a popsat průběh jejich šíření v Arábii a Africe na základě výzkumného materiálu dostupného v archeogenetické laboratoři Archeologického ústavu AVČR v Praze. Výzkumná část postupuje podle tradičního členění, krátce je představeno historické pozadí analyzovaných populací, které reprezentuje sedm souborů afrických Arabů z Nigérie, Čadu, Súdánu a Egypta a šest souborů z Jemenu a Ománu. Detaily jsou uvedeny v kapitolách *Materiál*, *Metody* a *Vyhodnocení dat*, kde je prezentován postup zpracování vzorků a jejich následná analýza. Výsledky jsou pak pomocí grafů a tabulek prezentovány ve stejnojmenné kapitole. *Diskuze* je věnována interpretaci výsledků v kontextu historických a archeologických poznatků a rovněž srovnání s výsledky předchozích studií Laboratoře archeogenetiky Archeologického ústavu AVČR v Praze týkajících se mitochondriální a Y chromozomální DNA výše uvedených nebo sousedních populací. Závěrem jsou shrnuty hlavní poznatky této práce.

2 Laktázová persistence – přehled současných znalostí

2.1 Mléko a jeho složení

Produkce mléka pro výživu mláďat je hlavním znakem charakterizujícím třídu *Mammalia* – savce. Lidé se však od ostatních savců v konzumaci mléka liší. Po nástupu zemědělské technologie začali využívat mléko některých domestikovaných zvířat jako běžnou potravinu a rovněž jako surovinu k získávání tuku, k výrobě sýrů a dalších produktů.

Mléko jednotlivých druhů savců se liší v poměru jednotlivých složek. Pro jejich základní přehled viz Tabulka 1, ta zároveň ukazuje, že lidské mléko má poměrně vysoký podíl laktózy.

Tabulka 1: Obsah živin v mléce vybraných savců v % (Belitz et al. 2009)

	<i>proteiny</i>	<i>kaseiny</i>	<i>syrovátka</i>	<i>laktóza</i>	<i>tuk</i>	<i>popel</i>
<i>člověk</i>	0,9*	0,4	0,5	7,1	4,5	0,2
<i>tur</i>	3,2	2,6	0,6	4,6	3,9	0,7
<i>osel</i>	2	1	1	7,4	1,4	0,5
<i>kůň</i>	2,5	1,3	1,2	6,2	1,9	0,5
<i>velbloud</i>	3,6	2,7	0,9	5	4	0,8
<i>zebu</i>	3,2	2,6	0,6	4,7	4,7	0,7
<i>jak</i>	5,8			4,6	6,5	0,9
<i>buvol</i>	3,8	3,2	0,6	4,8	7,4	0,8
<i>koza</i>	3,2	2,6	0,6	4,3	4,5	0,8
<i>ovce</i>	4,6	3,9	0,7	4,8	7,2	0,9
<i>sob</i>	10,1	8,6	1,5	2,8	18	1,5
<i>kočka</i>	7	3,8	3,2	4,8	4,8	0,6
<i>pes</i>	7,4	4,8	2,6			
<i>králík</i>	10,4					

*po patnácti dnech kojení se podíl proteinů zvýší o 1,6 %, popel – hrubý ukazatel množství minerálních látek ve vzorku

Jeden litr kravského plnotučného mléka, které dnes běžně konzumujeme, obsahuje 35 g tuku (ve 3,5% homogenizovaném mléce), 32 g proteinů, 1 g solí a 46 g laktózy a zbylý objem tvoří voda. Mléčný cukr – laktóza je disacharid tvořený glukózou a galaktózou. Co se týče proteinů, typické jsou kaseiny, které tvoří zhruba 80 % celkového obsahu bílkovin. Dále jsou zastoupeny laktoglobuliny, albumin, laktoferin

a v menších koncentracích i další. Mléčný tuk je směsí převážně triacylglycerolů, přítomny jsou také např. fosfolipidy či cholesterol. V mléce rovněž nalézáme minerální látky a vitaminy. Z tohoto hlediska je mléko cenné především jako zdroj vápníku. Obsah vybraných substancí v mléce udává Tabulka 2 (Pereira 2014; Walstra et al. 2006).

Tabulka 2: Obsah vybraných minerálních látek a vitamínů v 1 l plnotučného kravského mléka a jejich doporučená denní dávka (DDD). (Pereira 2014; Walstra et al. 2006; DDD podle Vyhláška 352/2009 Sbírky zákonů ČR)

<i>látk</i>	<i>chemický název</i>	<i>mg / l</i>	<i>DDD mg</i>
<i>Vápník</i>	Ca	1190-1300	800
<i>Fosfor</i>	P	900–1010	700
<i>Hořčík</i>	Mg	110–140	375
<i>Draslík</i>	K	1500–1660	2000
<i>Vitamin A</i>	Retinol Betakaroteny	0,7-1,3	0,8
<i>Vitamin D</i>	Kalciferoly	0,001-0,008	0,05
<i>Vitamin B₁</i>	Thiamin	0,4-0,5	1,1
<i>Vitamin B₂</i>	Riboflavin	1,4-1,8	1,4

2.2 Trávení laktózy

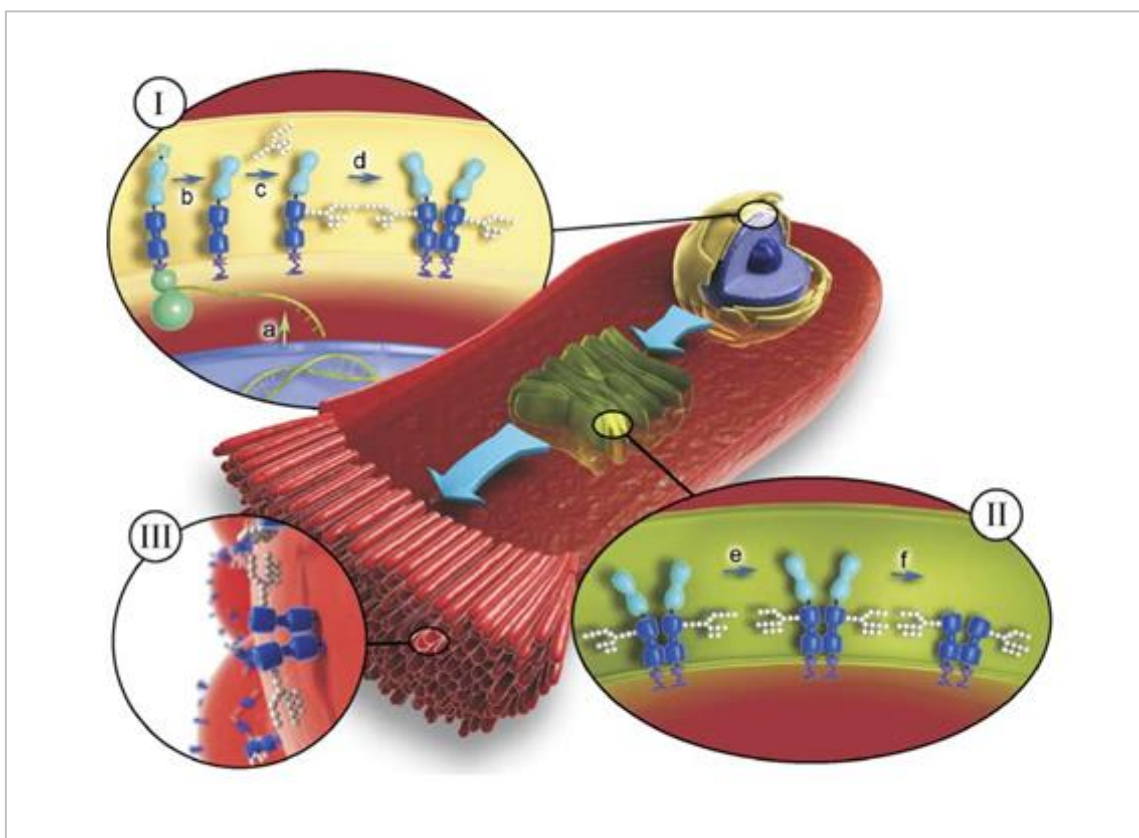
Mléčný cukr (laktóza) je obsažen v různém množství ve všech typech savčího mléka, kromě mléka lachtanovitých a mrožovitých (Reich and Arnould 2007; Urashima et al. 2001).

Laktóza (*O*-β-D-galaktopyranosyl-(1→4)-D-glukopyranóza), viz Obrázek 1, patří mezi disacharidy, skládá se z monosacharidů glukózy a galaktózy (Voet and Voet 2011). Pro jejich další metabolizování je nutno rozštěpit β-(1→4) glykosidickou vazbu, jíž jsou spojeny.



Obrázek 2: LPH s umístěním dvou enzymatických aktivit (upraveno podle Troelsen 2005)

Gen pro LPH se nazývá *LCT*, u člověka je lokalizován na druhém chromozomu v místě 2q21.3, má 49,36 kb a 17 exonů. Po transkripci je na základě mRNA translací vytvořen prekurzorový protein obsahující 1 927 aminokyselin, který je do výsledné podoby modifikován během transportu do membrány mikrokلك (Liebert 2012; Troelsen 2005), viz Obrázek 3.



Obrázek 3: Syntéza LPH a v enterocyty (I, II) a její umístění v membráně mikrokلك (III) (Troelsen 2005)

LPH je u savců standardně syntetizována jen v období, kdy jsou kojeni, nejvíce je produkována ve středním kyčelníku (Swallow 2003; Troelsen 2005). Po odstavení její produkce klesá. Studie, jež sledovaly tuto problematiku u lidí, ukazují, že pokles její produkce můžeme zaznamenat již od konce druhého roku, avšak není to pravidlem (Wang et al. 1998). Tento věk se rovněž liší v různých populacích, např. u Asiatů byl zaznamenán výrazný pokles už od druhého roku věku (Keusch et al. 1969; Troelsen 2005), zatímco u finské a somálské populace mezi 5–10 rokem, přičemž u somálských dětí tento pokles začínal o něco dříve než u finských dětí (Rasinperä et al. 2004; Troelsen 2005). Přesný mechanismus regulace genové exprese laktázového genu během kojeneckého období a po odstavení stále není úplně jasný. Obecně se předpokládá, že je regulován již na transkripční úrovni (Troelsen 2005). Výsledky některých studií ukazují, že by produkce LPH mohla být regulována thyroïdními a glukokortikoidními hormony (Chaudhry et al. 2008; Suzuki et al. 2014). Nejnovější studie pak poukazuje na význam epigenetických regulací v tomto procesu (Labrie et al. 2016).

Po odstavném poklesu produkce LPH, může pití čerstvého mléka způsobovat trávicí obtíže díky tomu, že je nerozštěpená laktóza fermentována mikroflórou distálního kyčelníku tlustého střeva. Vznikají při tom mastné kyseliny s krátkým řetězcem, vodík, metan a další metabolity. Osmotická rovnováha tlustého střeva je tak narušena a běžné symptomy, jež můžeme pozorovat, jsou nadýmání a průjem – většinou se dostaví zhruba do dvou hodin po požití laktózy. Tento stav se nazývá primární laktózová intolerance (Matthews et al. 2005; Vandenplas 2015). Symptomy jsou individuálně různě silné a rovněž závisí na množství požití laktózy. Rovněž je zde otázka složení střevní mikrobiomu, jež je populačně-specifický a závislý na životních podmínkách (Schnorr et al. 2016)

Neschopnost trávit laktózu může mít i jiné příčiny. Existuje např. poměrně vzácná porucha tzv. kongenitální laktázová deficiencie, což je částečná malabsorpce laktózy, jež se projevuje brzy po narození a může vést až k dehydrataci a acidóze organismu (Järvelä et al. 2009; Vandenplas 2015). Další příčinou neschopnosti metabolizovat laktózu může být tzv. sekundární laktázová intolerance, která nastává po poškození tenkého střeva (například celiakií, či Crohnovou chorobou). V tomto případě se produkce laktázy po uzdravení může opět obnovit (Vandenplas 2015).

Zaživací obtíže se při primární laktázové intoleranci dostaví při příjmu více než 12 g laktózy, což odpovídá zhruba 240–260 ml mléka. Jedna sklenice čerstvého mléka denně by tedy zdravému člověku neštěpícímu laktózu neměla působit větší problémy (Suarez et al. 1995), avšak existují individuální rozdíly.

Je třeba také uvést, že kysané mléčné výrobky obsahují laktózy méně, neboť je zde štěpena bakteriálními kulturami (např. *Streptococcus thermophilus* nebo *Lactobacillus bulgaricus*) (de Vrese et al. 2001; Savaiano and Levitt 1987). V tvrdých sýrech a másle by už laktóza neměla být obsažena vůbec (Silanikove et al. 2015). Konzumace kysaných mléčných výrobků může mít pozitivní efekt na trávení laktózy, díky enzymům (β -galaktosidázám), jež produkují bakterie mléčného kvašení. Například jogurtová bakterie *Lactobacillus acidophilus* je odolná vůči žlučovým kyselinám a dokáže přežít transport do tenkého střeva, zde pak napomáhá trávení laktózy, a dokonce i neživé bakterie s aktivní β -galaktosidázou mají tento efekt. Dlouhodobá konzumace kysaných mléčných výrobků tak může vést ke snížení závažnosti symptomů spojených s požitím většího množství laktózy (de Vrese et al. 2001).

2.3 Laktázová persistence

Primární laktázová intolerance, tedy pokles produkce laktázy po ostavení je považována za původní fenotyp, který se v celosvětovém měřítku vyskytuje u zhruba u 65 % lidí. U zbylých 35 % je přítomen druhotně vzniklý stav, kdy je v tenkém střevě produkován enzym laktáza i poté, co savčí mládě přestane být závislé na mateřském mléce, jedná se o tzv. laktázovou persistenci (LP). Nositelé fenotypu LP jsou tak schopni přijímat velké množství mléka po celý život bez zaživacích obtíží. Výskyt LP byl zatím prokázán pouze u lidí; jedná se zřejmě o adaptaci na nový typ stravy související s mléčnou produkcí, který se objevil se zavedením zemědělských technologií před zhruba deseti tisíci lety na Předním východě či později jinde ve světě (Gerbault 2013; Holden and Mace 2002; Ingram et al. 2009a).

2.3.1 Genetické principy laktázové persistence

Skutečnost že mezi lidmi existují rozdíly v tom, jak jejich organismus tráví mléko, bylo známo odnepaměti, avšak přesná příčina tohoto jevu zůstávala dlouhou dobu nejasná.

V roce 1973 bylo studií provedenou ve finských rodinách prokázáno, že se primární laktózová intolerance dědí jako autozomálně recesivní znak (Sahi 1974; Sahi et al. 1973), z čehož vyplynulo, že LP musí být předávána autozomálně dominantní dědičností.

Pozdější studie ukázaly, že aktivita laktózy koreluje s množstvím mRNA v enterocytu. Regulace produkce LPH tedy probíhá už na úrovni transkripce transkripčními faktory, které rovněž zajišťují tkáňově a buněčně specifickou regulaci produkce LPH (Troelsen 2005; Wang et al. 1998). Vyšlo rovněž najevo, že tyto transkripční faktory jsou ovlivněny cis-regulačními elementy (CREs – *cis-regulatory elements*) (Spodsberg et al. 1999; Wang et al. 1995). CREs jsou regulační sekvence ležící na stejném vlákně jako regulovaný gen a obvykle vzdálené do 1 Mb od jeho promotoru (Siepel and Arbiza 2014).

Hledání přesné příčiny LP pokračovalo, ve studii Enattah et al. 2002 autoři opět použili finské rodiny se známým statusem LP, u nichž identifikovali 200 kb dlouhý úsek ve vazebné nerovnováze, jež zahrnoval *LCT* gen (lidský gen pro LPH) a jeho okolí. Následně určili tzv. kritickou oblast o délce 47 kb a v rámci tohoto úseku byly určeny dvě SNP mutace, jež jsou asociovány LP fenotypem (Enattah et al. 2002).

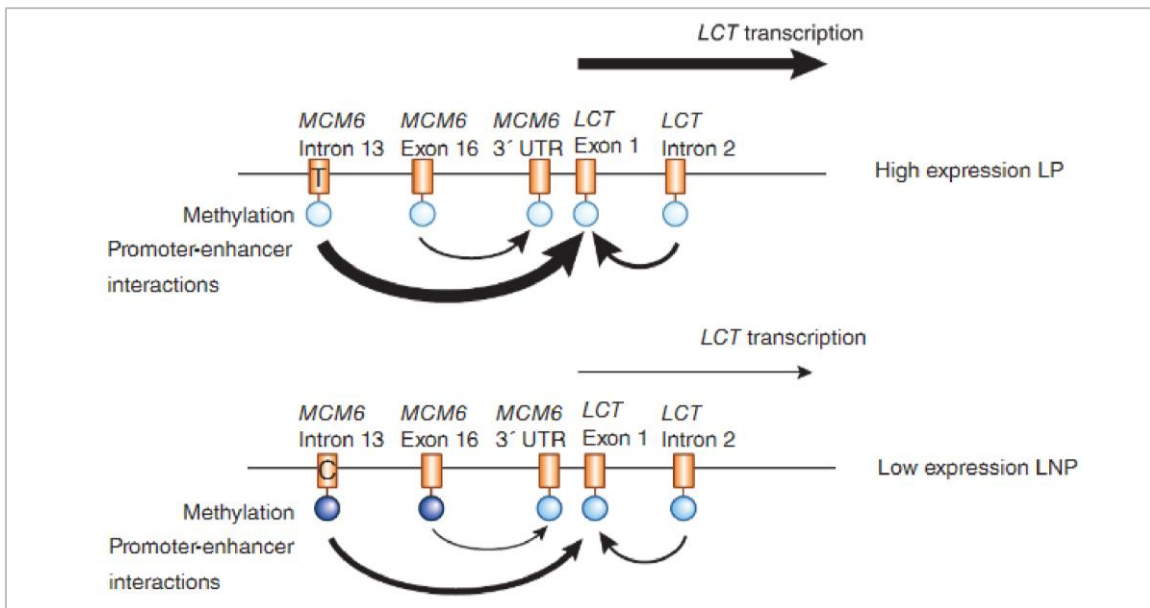
Je zajímavé, že dvě nově objevené alely se nacházejí v intronech sousedního genu *MCM6* (*minichromosome maintenance gene 6*). Záměna cytosinu (C) za thymin (T) je ve třináctém intronu, vzdálená 13 910 bp proti směru transkripce (*upstream*) od promotoru *LCT* genu a záměna guaninu (G) za adenosin (A) je v devátém intronu 22 018 bp *upstream* (Enattah et al. 2002). Pro tyto varianty nebo mutace se užívá označení –13910*T a –22018*A.

V počátcích zkoumání toho, jak působí –13910*T bylo *in vitro* prokázáno, že pozice –13 910 má enhancerovou aktivitu, tj. pomáhá zesilovat transkripci. Pokud je tedy na pozici –13 910 alela T, je enhancerová aktivita zhruba 4x vyšší, než pokud je zde alela C (Olds and Sibley 2003; Troelsen et al. 2003). Enhancerová aktivita je způsobena tím, že –13910*T váže mnohem silněji jeden z transkripčních faktorů – Oct-1 (*octamer-binding transcription factor 1*). –13910*T zajišťuje produkci LPH i po té, co by měl nastat po-odstavný pokles (Lewinsky et al. 2005). Na regulaci transkripce *LCT* genu se podílí kromě Oct-1 i další transkripční faktory jako je HNF1 α (*hepatocyte*

nuclear factor 1 α), HNF1 β , HNF4 α , GATA (*gata binding protein*), Cdx-2 (*caudal-type homeobox transcription factor 2*) nebo Fox (*forkhead box*).

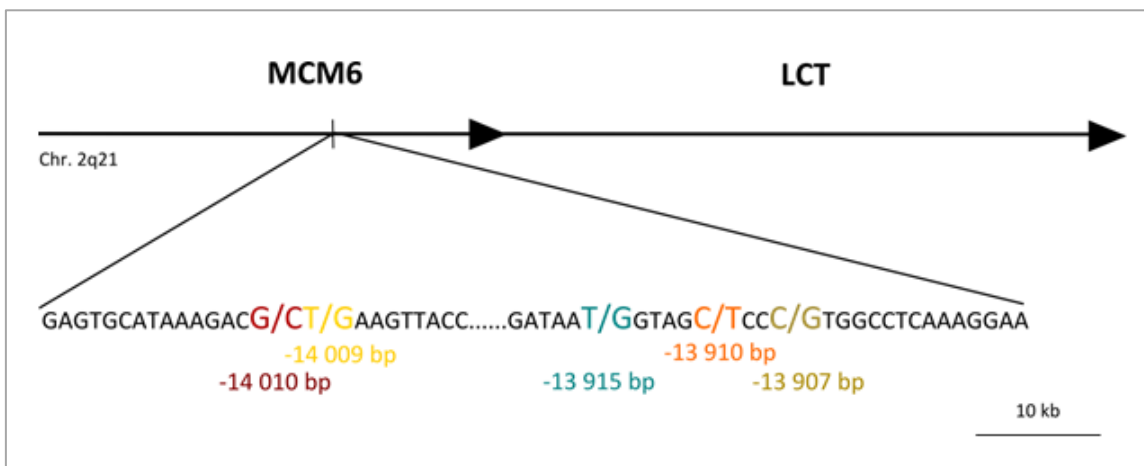
Rikke H. Lewinsky přepokládal, že snížení produkce LPH může začít již na úrovni transkripce, kdy jsou místa pro uvedené transkripční faktory obsazovány represory, nebo je transkripce regulována tím, že jsou transkripční faktory přijímány méně. Při navázání Oct-1, by se naopak měly aktivátory transkripce stále navazovat nebo by se mělo zastavit navazování represorů (Lewinsky et al. 2005). Mutace –22018*A která je přítomna současně s –13910*T, byla studována rovněž, avšak u ní enhancerová aktivita prokázána nebyla, příčinou LP je v tomto případě jen –13910*T (Olds and Sibley 2003; Rasinperä et al. 2004; Troelsen et al. 2003).

Studie Labrie et al. 2016 ukázala na myším modelu a lidských dobrovolnících, jak epigenetické změny regulují produkci LPH. Autoři objevili u lidí několik regulačních oblastí v genech *MCM6* a *LCT*. V enterocytech jsou tyto oblasti genomu postupem času modifikovány epigenetickými změnami (např. metylací) a produkce mRNA se postupně snižuje. Pro srovnání byly analyzovány i leukocyty – zde byly regulační oblasti od začátku plně modifikovány. Regulace tvorby LPH s narůstajícím věkem je pravděpodobně u savců evolučně nezměněna, ukazují na to dva vysoce konzervované úseky genomu – již zmiňovaný intron 13 genu *MCM6* a intron 2 genu *LCT*. Co se týče pozice –13 910, studie ukazuje, že pokud je zde genotyp CC, exon 16 a intron 13 genu *MCM6* jsou postupem věku modifikovány, zatímco je-li zde CT nebo TT, dochází k modifikaci jen částečně nebo žádné (Labrie et al. 2016; Swallow and Troelsen 2016); viz Obrázek 4.



Obrázek 4: Metylace enhanceru v genu *MCM6* a zeslabení exprese genu *LCT*. V rámečku *MCM6* Intron 13 je alela na pozici -13 910, různé odstíny modré znázorňují míru metylace a síla interakcí je znázorněna tloušťkou šipek (Swallow and Troelsen 2016)

Kromě -13910*T, se zřejmě nezávislým vývojem objevily další mutace zodpovědné za LP ve stejné oblasti intronu 13 *MCM6* – jedná se o -14010*C, -14009*G, -13907*G a -13915*G (Enattah et al. 2008; Imtiaz et al. 2007; Ingram et al. 2007; Jones et al. 2013; Tishkoff et al. 2007). Pro přesnou lokalizaci mutací v rámci genu *MCM6* viz Obrázek 5.



Obrázek 5: Geny *MCM6* a *LCT* (šipkou je znázorněn směr transkripce) a schematické znázornění pozice pro-LP mutací.

Testováním *in vitro* bylo prokázáno, že všechny výše uvedené mutace mají rovněž enhancerovou aktivitu, tedy působí stejným mechanismem jako -13910*T (Jones et al. 2013; Liebert et al. 2016; Tishkoff et al. 2007). U -14010*C bylo dále zjištěno, že se nachází rovněž v jedné ze dvou oblastí, kde se navazuje Oct-1, jejíž efekt je tedy stejný jako -13910*T. Je rovněž pravděpodobné, že -14009*G, jež je hned vedle -14010*C, a mutace -13907*G a -13915*G, které těsně sousedí s -13910*T, působí obdobně (Jensen et al. 2011). Nicméně pro -14009*G bylo později prokázáno, že princip jejího působení je nejspíš jiný než -14010*C (Liebert et al. 2016).

Existují i další mutace, které by potencionálně mohly rovněž LP způsobovat. Jedná se například o -13914*A (Khabarova et al. 2010; Tag et al. 2007) a -13913*C (Ingram et al. 2007), avšak jejich vliv na expresi LPH nebyl však zatím *in vitro* potvrzen. U mutace -13913*C byl prokázán její výskyt i u osob co laktózu netráví (Jones et al. 2013). Dalšími studovanými variantami byla -14028*C a -13779*C, která byla nalezena u pastevců Toda z jižní Indie. Analýzou *in vitro* byl však jejich efekt potvrzen jen z části (Gallego Romero et al. 2012; Liebert et al. 2016). Pro detaily o všech uvedených mutacích viz Tabulka 3.

Tabulka 3: Mutace v intronu 13 *MCM6* spojované s LP.

<i>fyzická pozice na chromozomu 2</i>			<i>rs</i>	<i>ancestrální alela</i>	<i>odvozená alela</i>
<i>bp od LCT</i>	GRCh38	GRCh37			
-14 010	135851176	136608746	rs145946881	G	C
-14 009	135851175	136608745	rs869051967	T	G
-13 915	135851081	136608651	rs41380347	T	G
-13 910	135851076	136608646	rs4988235	C	T
-13 907	135851073	136608643	rs41525747	C	G
-14 028*	135851194	136608764	rs759157971	T	C
-13 914*	135851080	136608650	rs773131166	G	A
-13 913*	135851079	136608649	rs41456145	T	C
-13 779*	135850945	136608515	rs527991977	G	C

Mutace označené * nebyly zatím prokázány testováním *in vitro* jako pro-LP. V tabulce je uvedena poloha polymorfismů vůči *LCT* genu a dále fyzická poloha na chromozomu podle novější verze referenčního genomu GRCh38 a podle starší, avšak stále často používaného GRCh37, dále rs číslo (*Reference SNP ID*, referenční číslo polymorfismu) a původní varianta polymorfismu a mutovaná, jež je spojována s LP

2.3.2 Měření fenotypu laktázové persistence

Metody k experimentálnímu určení, zda jedinec tráví laktózu, byly navrženy a používány v klinické praxi mnohem dříve, než byla známa genetická příčina LP. Původně bylo jejich hlavním účelem diagnostikovat osoby s laktózovou intolerancí. Těchto metod existuje celá řada, zde však uvedeme jen ty používané v novějších studiích LP.

Metody můžeme dělit na invazivní a neinvazivní, z invazivních je nejběžnější intestinální biopsie. Pacientovi je, např. endoskopicky, odebrán vzorek střevní sliznice, z něhož je pak detekována aktivita střevních disacharidáz, včetně laktózy. Tato metoda není nejvhodnější pro běžné používání a nese s sebou určité riziko následných zdravotních komplikací, na druhé straně byla používána jako referenční k ostatním vyvíjeným metodám (Arola 1994; Rasinperä et al. 2004).

Pro měření v terénu se více hodí neinvazivní metody, mezi běžně využívané patří vodíkový dechový test – BHT (*breath hydrogen test*), test krevní glukózy – LTT (*lactose tolerance test*) a sledování symptomů po požití laktózy. Pojdme si nyní

přiblížit jejich metodiku a princip. Proband (zkoumaný jedinec) by měl před měřením minimálně osm, lépe dvanáct hodin hladovět (přijímat pouze vodu) a nepřijímat potravu ani během měření. Běžně se k vyšetření přistupuje ráno na lačno. Pro BHT se dále doporučuje se předchozí den vyvarovat nadýmových jídel. Proband by se rovněž měl těsně před měřením vyvarovat zvýšené fyzické aktivity a kouření (Arola 1994; Bernardes-Silva et al. 2007; Schirru et al. 2007). Ze studie by měly být vyloučeny osoby, jež v nedávné době užívaly antibiotika, nebo trpí onemocněním střev a cukrovkou.

Při BHH se používá speciální přístroj pro měření H_2 , existují i přenosné verze, jež se vejdou do menšího kufříku. Probandovi je nejprve na lačno změřen obsah H_2 v dechu (*baseline*), poté je mu podáno 25–50 g laktózy rozpuštěné ve zhruba 200 ml vody (laktóza je k dostání v lékárnách ve formě bílého prášku). Pokud proband laktózu netráví, laktóza se posune do tlustého střeva a zde ji metabolizují střevní bakterie, jež při tomto procesu uvolňují mimo jiné i vodík. Vodík se pak dostane krevním řečištěm do plic a je možné jej pomocí daného přístroje změřit. První měření se obvykle provádí 30 minut od požití laktózy a je pak opakováno každých 30 minut po dobu až čtyř hodin (Arola 1994; Heyer et al. 2011; Schirru et al. 2007).

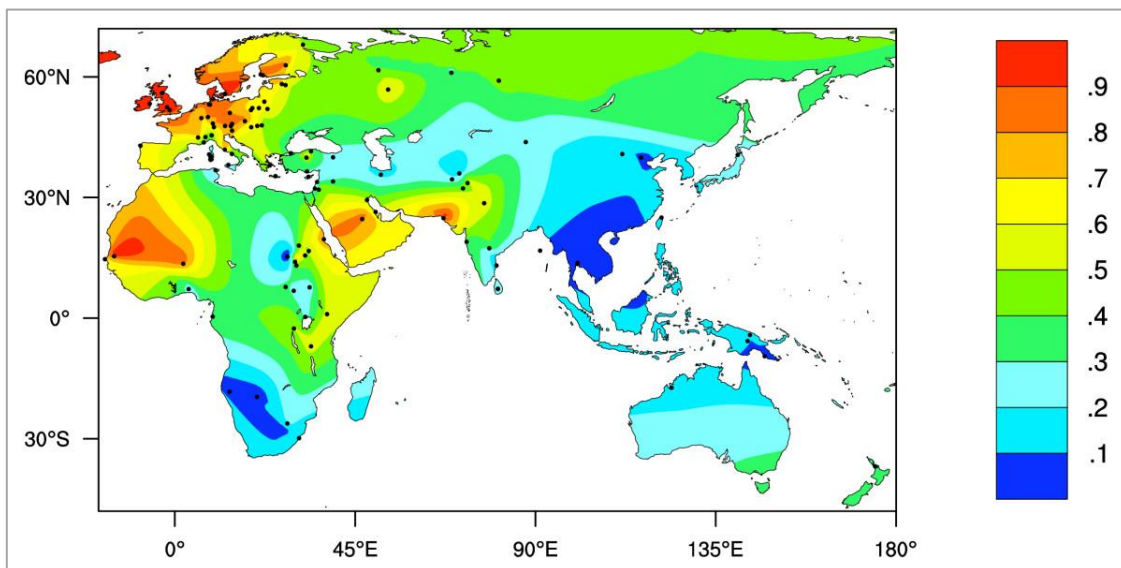
Při LTT testu je probandovi změřena nalačno *baseline* glykémie – množství krevního cukru (měření je možné provádět např. glukometrem určeným pro diabetiky), poté je mu podána laktóza (50 g ve 200 ml H_2O) a následně je měřen vzestup glykémie po 20-ti, 40-ti, 60-ti případně i 80-ti minutách. U probandů, jež tráví laktózu (štěpí ji na glukózu a galaktózu) zaznamenáme výrazný vzestup krevní glukózy (Arola 1994; Mulcare et al. 2004; Tishkoff et al. 2007).

Dalším kritériem, zda zařadit probanda do skupiny co tráví či netráví laktózu, jsou symptomy. Osoby, jež laktózu nevstřebávají, mohou díky metabolitům bakterií tlustého střeva pociťovat nadýmání, křeče a rovněž se může dostavit průjem. Dle testů, které byly prováděny na dobrovolnících z PŘF UK, byly zažívací potíže u jedinců netrávících laktózu docela běžné, ale u fulbských pastevců v Burkiny Faso tomu tak nebylo (Černý, osobní sdělení). Tyto rozdíly mohou souviset s odlišným složením střevního mikrobiomu obou vyšetřovaných skupin a zasloužily by si jistě dalšího zkoumání.

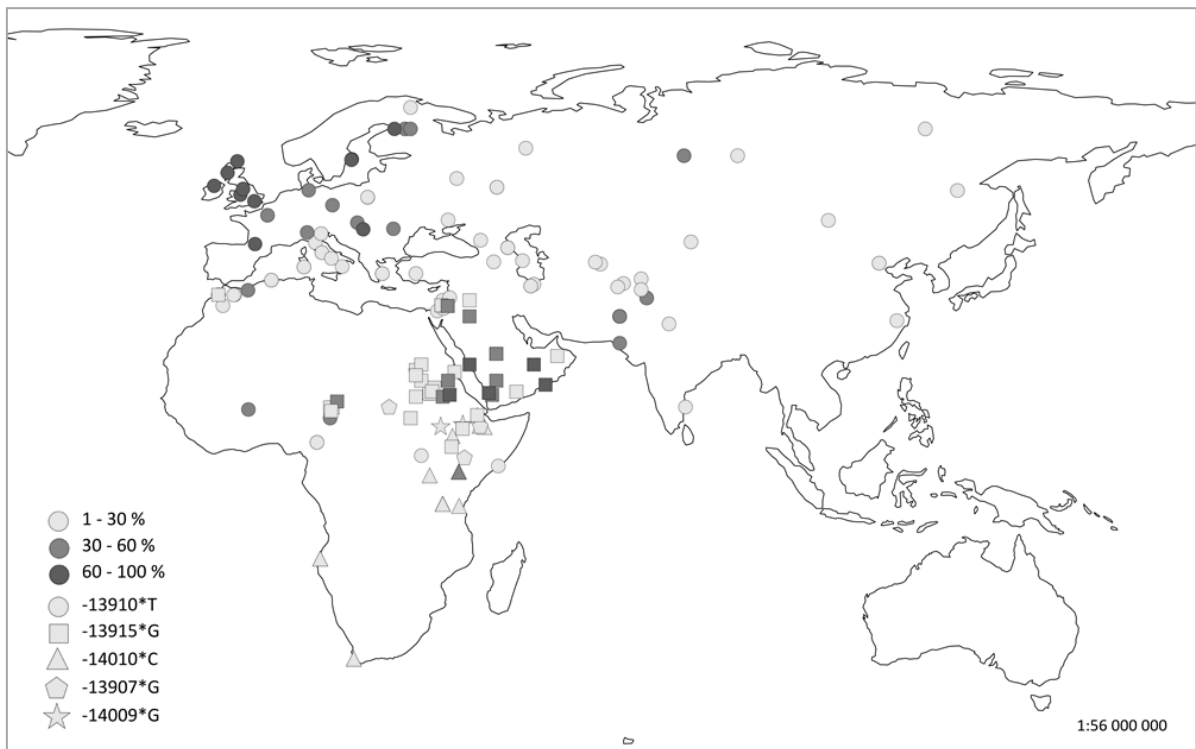
Je třeba poznamenat, že uvedené neinvazivní metody jsou zatíženy určitým rizikem chyby, například při BHT někteří probandi díky jiné skladbě střevních bakterií vodík nevylučují, nebo při LTT může nastat zvýšení glykémie díky opožděnému vyprazdňování potravy ze žaludku (Arola 1994). Pro zvýšení přesnosti se doporučuje použít více metod zároveň (Heyer et al. 2011; Mulcare et al. 2004), což je ovšem v terénu často hůře realizovatelné.

2.4 Rozšíření LP v dnešním světě

Jak bylo výše uvedeno, zhruba 65 % celosvětové populace netráví laktózu v dospělosti, tedy tato část vykazuje tzv. primární laktázou intoleranci, což je u savců původní stav (Ingram et al. 2009a; Itan et al. 2010). Zbýlých 35 % nositelů LP není zastoupeno rovnoměrně, existují oblasti jako jihovýchodní Asie, kde je podíl LP osob prakticky nulový, a naopak místa jako severní Evropa, kde téměř všichni mléčný cukr v dospělosti tráví; viz Obrázek 6. Rovněž rozmístění jednotlivých variant zodpovědných za LP není rovnoměrný. Mimo východní Afriku a Arábii nalézáme prakticky jen –13910*T, v Africe je ale zastoupeno všech pět mutací, na Arabském poloostrově pak dominuje –13915*G; viz Obrázek 7.



Obrázek 6: Interpolovaná mapa frekvencí LP fenotypu ve Starém světě. Body označují místa vzorkování (Itan et al. 2010).



Obrázek 7: Výskyt a zastoupení jednotlivých pro-LP variant ve Starém světě.

Mapa byla sestavena z vybraných populací na základě publikovaných dat (Al-Abri et al. 2012b; Hassan et al. 2016; Itan et al. 2010; Jones et al. 2015; Priehodová et al. 2014; Ranciaro et al. 2014).

2.4.1 LP v Evropě

Nejvyšší frekvence LP (89–96 %) jsou v severních částech Evropy, konkrétně na Britských ostrovech a Skandinávii, ale i severu Německa. Ve střední a západní Evropě pak nacházíme osob s LP o něco méně 62–86 %, směrem na jih a východ frekvence dále klesají na 15–56 % a například na Sardinii už jen 11 % (Itan et al. 2010). V Evropě tak můžeme pozorovat tzv. klinální distribuci znaku, tedy snižování podílu osob s LP ze severozápadu směrem na jihovýchod (Gerbault et al. 2011; Ingram et al. 2009a; Itan et al. 2010). Takový obraz ovšem narušují některé lokální populace, např. ve střední Itálii bylo identifikováno 81,6 % osob s LP a rovněž u jednoho ze souborů ze Španělska až 85 % a naopak u švédských Sámů byla změřena frekvence LP jen 59 % (Holden and Mace 2002; Itan et al. 2010).

Jako původní byla v Evropě identifikována mutace -13910^*T . Její frekvence jsou o něco nižší než frekvence samotné LP, protože fenotyp LP se projevuje

i v heterozygotním stavu. Pro představu nejvyšší frekvence -13910^*T byla určena v Severním Irsku 95 %, nejnižší frekvence byly naměřeny na jihu Evropy 6–36 % v Itálii a 9–13 % v Řecku (Itan et al. 2010).

Co se týče evropské části Ruska, dat o LP je dostupných méně než ze zbytku Evropy, avšak zdá se, že podíl osob s LP je zde o něco nižší, nicméně v oblasti blízko hranice s Finskem bylo určeno 41–52 % osob s LP. Z pro-LP variant byla určena jen -13910^*T a to 24 % z moskevské oblasti a 7–13 % z oblasti u Kaspického moře (Itan et al. 2010).

2.4.2 LP v Asii a u původních obyvatel Austrálie a Ameriky

V asijské části Ruska jsou naměřené frekvence fenotypu LP 22–60 %, přičemž opět zde byla určena jen -13910^*T a to ve frekvenci od 3 % do 33 % (Itan et al. 2010).

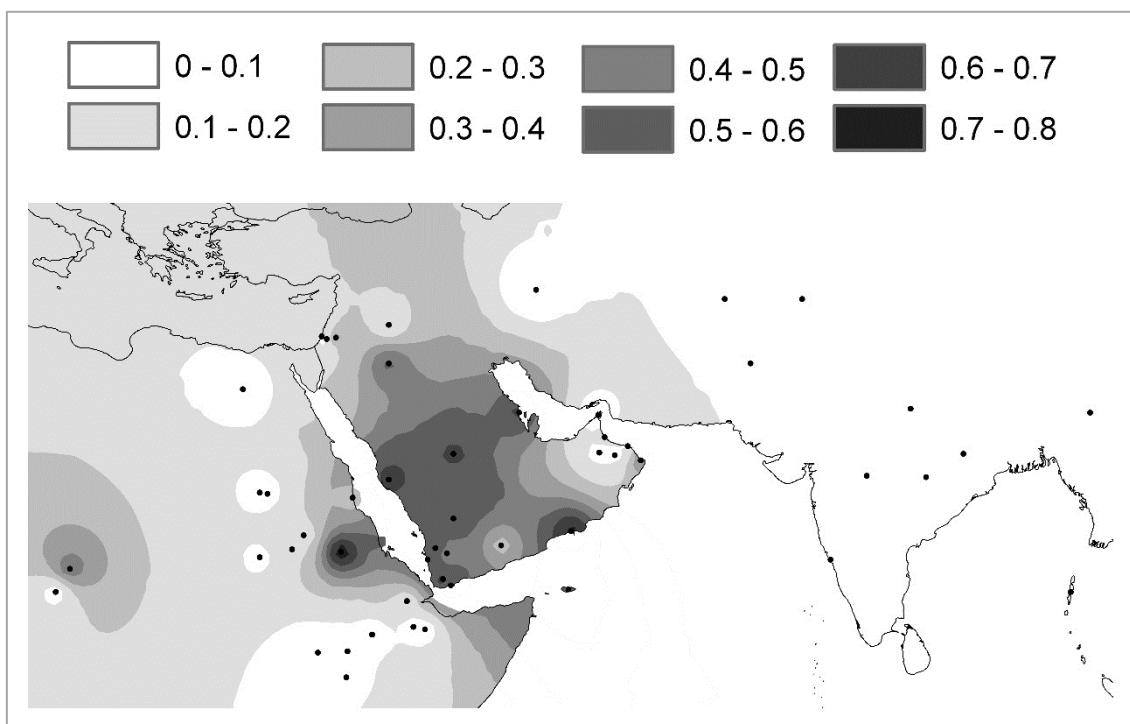
V Číně jsou frekvence LP velmi nízké, nevyšší naměřené hodnoty 12 % a 24 % byly u zde žijících Kazachů a Mongolů, u těchto populací byla učena -13910^*T v 10 %. Nutno podotknout že LP u Mongolů, jakožto tradičního pasteveckého národa, je velmi málo prostudována, nízké frekvence LP jsou vysvětlovány tím, že Mongolové konzumují tradičně kysané mléčné výrobky, v nichž je laktóza již rozštěpena bakteriemi mléčné fermentace (Holden and Mace 2002).

Ve střední Asii byla studována pastevecká populace Kazachů a populace Tádžiků a Uzbeků, jež jsou považováni za usedlé zemědělce. Podíl osob s LP byl 25–30 % u Kazachů a 11–19 % u Tádžiků a Uzbeků. Jediná pro-LP mutace -13910^*T byla ve frekvenci 17 % identifikována u Kazachů a 10 % u spojeného souboru Tádžiků a Uzbeků (Heyer et al. 2011).

Indický poloostrov je jedním z regionů Asie, kde nalézáme vysoké frekvence LP. Nejvyšší naměřené hodnoty fenotypu LP se pohybují od 39 % ve střední Indii po 73 % na severu Indie (Itan et al. 2010). Za LP zde odpovídá rovněž mutace -13910^*T , kterou nacházíme v rozsahu 1,2–49 %. Přes 40% výskyt této varianty je na severozápadě Indie u populací, jež se řadí k indoevropské jazykové větvi, zatímco nejnižší výskyt -13910^*T je na jihovýchodě u drávidských populací. Dále zde byla objevena ve 2,4 % varianta -13779^*G , která by potenciálně mohla být další pro-LP

mutací, avšak její efekt nebyl zatím potvrzen (Gallego Romero et al. 2012; Liebert et al. 2016).

Nejvyšší frekvence LP v rámci Asie jsou na Arabském poloostrově, a to až 86 % u beduinů (Itan et al. 2010). Ojedinele zde byly nalezeny varianty -13907^*G a -14010^*C a v nízkých frekvencích -13910^*T (tato alela měla nevyšší zastoupení u Ománců s asijským původem 15,6 %) (Al-Abri et al. 2012b; Priehodová et al. 2014). Avšak variantou, která zde jasně dominuje je -13915^*G , a sice od 6 % u Ománců s asijským původem až po 72 % u Ománců ze Zufáru (Al-Abri et al. 2012b). Nejvyšší frekvence v Saúdské Arábii pak byla zjištěna v západní části – 65 % (Imtiaz et al. 2007). Pro znázornění výskytu této varianty viz Obrázek 8, ten ukazuje její výskyt i v Africe, nikoli však Indii.



Obrázek 8 Interpolovaná mapa rozšíření mutace -13915^*G na Arabském poloostrově a v přilehlých oblastech (Priehodová et al. 2014)

V jihovýchodní Asii není LP rozšířena vůbec (Itan et al. 2010). Co se týče Austrálie a Nového Zélandu, ve dvou starších studiích byla zjištěna v 16 % u Australců a 36 % Maorů (Abbott and Tasman-Jones 1985; Brand et al. 1983; Itan et al. 2010).

Avšak novějších dat o LP u těchto populací je zatím velice málo a údaje o genotypu z těchto lokalit rovněž chybí.

U původních obyvatel Ameriky se LP rovněž nevyskytuje vůbec nebo jen ve velmi nízkých frekvencích (mutace –13910*T). To je zřejmě dáno genovým tokem od přicházejících Evropanů (Friedrich et al. 2012; Holden and Mace 2002; Paz-Y-Miño et al. 2016).

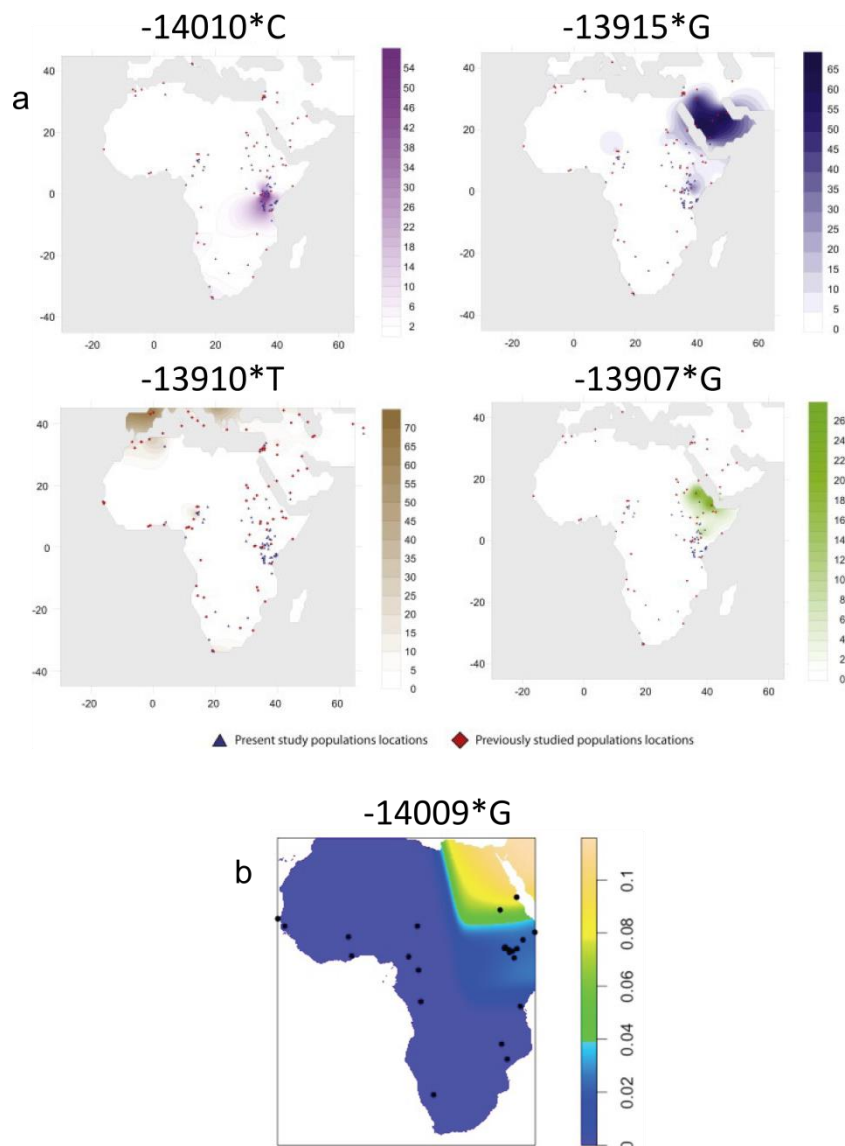
2.4.3 LP v Africe

Na základě studia různých genetických polymorfismů bylo zjištěno, že Afrika je místem nejvyšší genetické diverzity (Reed and Tishkoff 2006) a platí to i v případě LP. V Africe nacházíme všech pět variant zodpovědných za LP (Enattah et al. 2008; Ingram et al. 2007; Jones et al. 2013; Tishkoff et al. 2007). Na rozdíl od Evropy je zde LP rozmístěna nerovnoměrně – často populace pastevců s vysokým podílem osob s LP sousedí s populací zemědělců, kteří nemají LP vůbec.

Jedny z nejvyšších frekvencí fenotypu LP byly zjištěny ve východní Africe u Masajů a Bedžů – téměř 90 % (Itan et al. 2010; Ranciaro et al. 2014; Tishkoff et al. 2007), ale vysoké frekvence jsou i v západní Africe, například až 100 % u Fulbů (vzorek obsahoval jen 29 měřených jedinců, ale všichni laktózu trávili (Arnold et al. 1980; Itan et al. 2010)) či 87 % u Tuaregů, ale překvapivě i u některých usedle žijících populací jako jsou senegalští Sererové – 71 %. Ze severní Afriky je údajů o fenotypu méně, frekvence fenotypu LP se pohybují mezi 15 % a 40 % v Egyptě a Tunisu. U jihoafrických khoisanských populací se LP vyskytuje ve 3–35 %, u namibijské bantuské populace Hererů byl pak změřen fenotyp LP u 3 % zkoumaných osob (Itan et al. 2010)

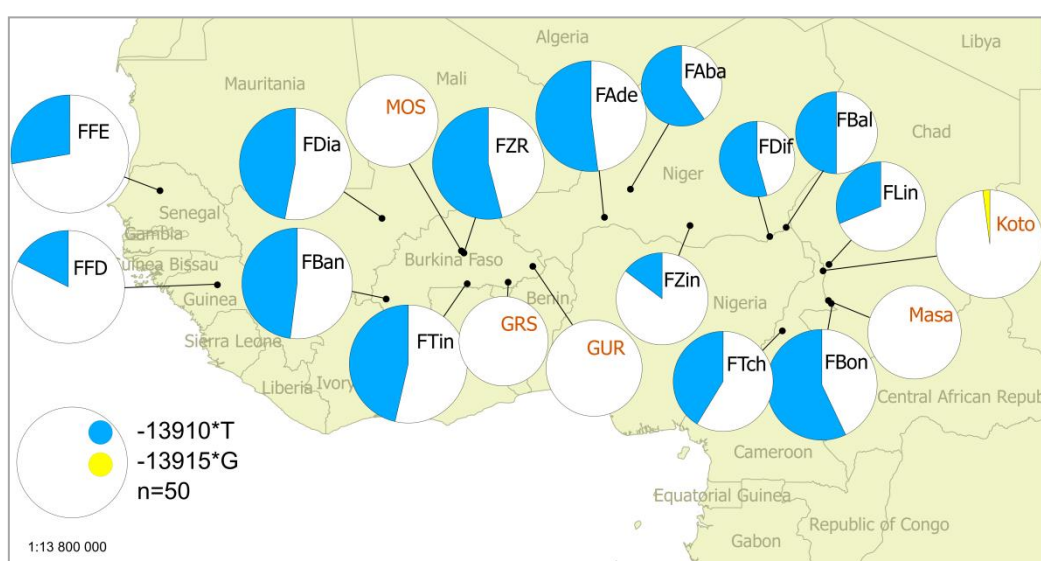
Východní Afrika je pak místem s výskytem různých pro-LP mutací. –14010*C byla určena u populací patřících jak do afroasijské, tak i nigerokordofánské nebo nilosaharské jazykové větve, přičemž jedny z nejvyšších frekvencí této mutace (68,2 %) byly objeveny u keňských Masajů nilotského původu (Ranciaro et al. 2014). –13907*G je typická pro afroasijské populace Keni, Etiopie a Tanzanie, ale nevyšší frekvence (25 %) byla nalezena u kúšitských Bedžů (Jones et al. 2015; Ranciaro et al. 2014; Tishkoff et al. 2007). –13910*T se vyskytuje v nejvyšší míře (48 %) u súdánských

Fulbů (Enattah et al. 2008) a -13915^*G je nejfrekventovanější (77 %), u súdánských Arabů Rašajda (Priehodová et al. 2014). -14009^*G byla objevena rovněž pouze u afroasijských populací Etiopie a Keni, nevyšší zaznamenaná frekvence je 13 % u Arabů ze Súdánu (Priehodová et al. 2014) a 11,7 % súdánských Bedžů kmene Beni Amer (Jones et al. 2015). Četnosti jednotlivých alel zachycuje Obrázek 9. K publikaci máme připravené výsledky populace Bedžů ze Súdánu, u kterých jsme určili zatím nejvyšší známý podíl osob s -14009^*G – 42 %.



Obrázek 9: Interpolované mapy znázorňující frekvence pro-LP mutací
a: -14010^*C , -13915^*G , -13910^*T a -13907^*G ; podle Ranciaro et al. 2014,
b: -14009^*G ; podle Jones et al. 2015

V severní a západní Africe byla identifikována převážně -13910^*T , která se ve 22 % se vyskytuje např. u alžírských Berberů. V naší archeogenetické laboratoři byla zjištěna také u tuarežských pastevců v 41 % (Šmídková 2016). -13910^*T je typická pak rovněž pro Fulby; např. u malijské skupiny byla zjištěna ve frekvenci 37 % (Lokki et al. 2011). Naše dosud nepublikované výsledky analýzy čtrnácti lokálních fulbských populací potvrdily tuto mutaci u všech zkoumaných souborů, přičemž nejvyšší frekvence (59,6 %) byla objevena u nigerských Fulbů z okolí města Abalak, viz Obrázek 10. Obrázek rovněž ukazuje výše uvedený fakt rozdílu v LP frekvencích mezi pasteveckými a usedle žijícími zemědělskými populacemi.



Obrázek 10: Výskyt pro-LP mutací u západoafrických Fulbů (názvy černě) a u sousedních usedlých populací (názvy oranžově). FFE – Fulbové Ferlo, FFD – Fulbové Fouta Djallon, FDia – Fulbové Diafarabe, FBan – Fulbové Banfora, FTin - Fulbové Tindangou, FZR – Fulbové Ziniare, FAde – Fulbové Ader, FAba – Fulbové Abalak, FZin – Fulbové Zinder, FDif – Fulbové Diffa, FBal – Fulbové Balatungur, FLin – Fulbové Linia, FTCh – Fulbové Tcheboua, FBon – Fulbové Bongor, MOS – Mossi, GRS – Gurunsi, GUR – Gourmantche, Koto – Kotoko. Masa – Massa. (Priehodová 2016 – nepublikováno).

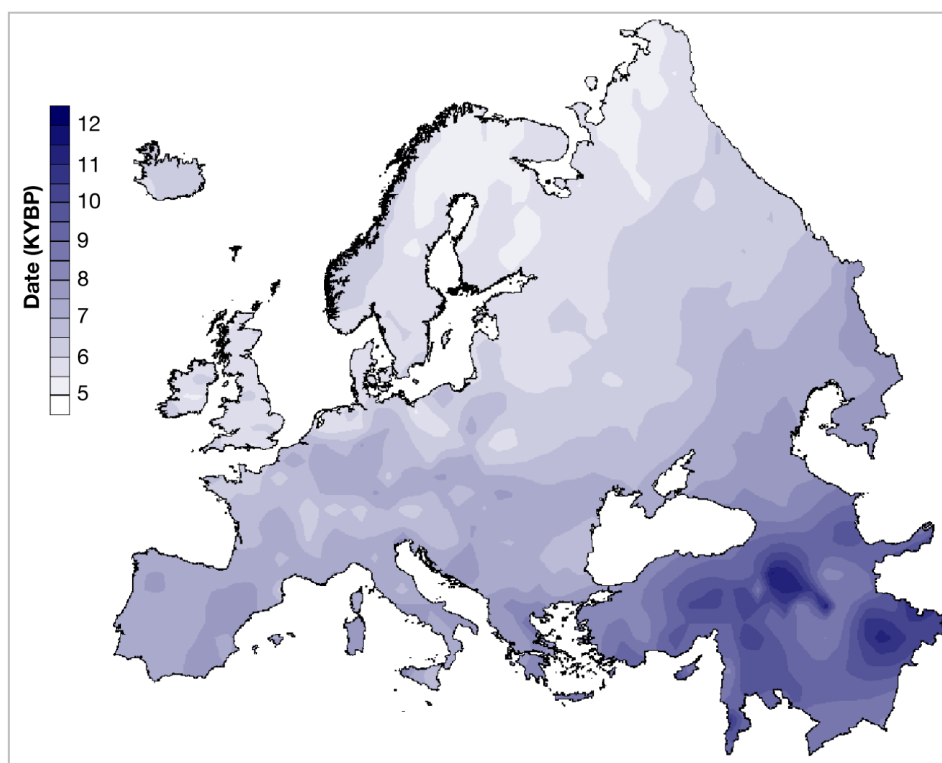
Do jižní Afriky pak byla pravděpodobně v rámci migrací z východní a střední Afriky zanesena -14010^*C , jejíž nevyšší výskyt zaznamenáváme u namibijských Khoiů ve frekvenci 20,5 % (Breton et al. 2014). Nejspíše díky evropským kolonialistům se zde nachází i -13910^*T , v nevyšším zastoupení u jihoafrické populace Wellington Coloured ve frekvenci 17,5 % (Breton et al. 2014).

2.5 Historicko-kulturní kontext

2.5.1 Neolit a počátky mléčného hospodářství

Milníkem pro vznik a šíření LP je období, kdy lidé přešli z lovu zvířat a sběru rostlin k výrobě potravin prostřednictvím domestikovaných druhů; tzv. neolitická revoluce (Childe 1953). Za kolébku zemědělství je tradičně považován Přední východ, kde archeologické doklady ukazují na počátky domestikace už před více než 10 000 lety (Bar-Yosef 1998; Flannery 1973; Richards 2002). V tomto období se tu lidé věnovali nejen pěstování pšenice a ječmene, ale i chovu koz, ovcí a hovězího dobytka (Bar-Yosef 1998; Helmer et al. 2005; Peters et al. 2005; Zeder 2008).

Zemědělství se před 8 000–9 000 lety začalo šířit do okolních oblast především východní Evropy a Balkánu, tedy po obou stranách Černého moře (Obrázek 11), ale také na Střední východ a později povodím Nilu i do východní Afriky, přičemž docházelo k rozpadu populační struktury původně diferencovaných časně zemědělských populací (Lazaridis et al. 2016).



Obrázek 11: Chronologický rámeček šíření zemědělství v rámci Předního východu, Anatólie a Evropy; KYBP – *kilo year before present*, tisíc let před současností (Balaresque et al. 2010; Pinhasi et al. 2005).

Dalším historickým milníkem byla tzv. revoluce druhotných produktů (termín pochází od britského archeologa Andrewa Sheratta). Domácí zvířata se po nějakém čase začala využívat rovněž během jejich života, a to pro vlnu, mléko nebo k tahu (Sherratt 1983). Podle tradičního pojetí je tento komplex znalostí charakteristický pro období, jež nazýváme eneolit. Pro eneolit je dále typický vynález pluhu a metalurgie mědi. Pro některé oblasti je tak tato epocha označována termínem chalkolit nebo jednoduše doba měděná (Neustupný 2008).

Co se týče chronologie, dalo by se říci, že eneolit přichází zhruba o 2 000 a více let po počátku neolitu. Například na Předním východě je datován do období před 6 500–8 000 lety, na našem území pak před 4 200–6 500 lety (Greenfield 2010; Neustupný 2008). Větší počet důkazů o zpracování vlny a využívání pluhu máme z období zhruba před 6 000 lety z Mezopotámie a před 5 000 lety pak z Evropy a severní Afriky (Vigne and Helmer 2007).

Metod, jak zjistit zda bylo provozováno mléčné hospodářství, může být několik. Jednou z nich je určování pohlaví a porážkového stáří z kosterních pozůstatků domácích zvířat. Zvířata využívaná pro masnou produkci (tedy během neolitu) byla porážena v období, kdy se jim zpomalí růst, tedy např. u skotu ve 2–4 roce. Byly-li ale zabíjeny starší kusy, tedy více než osmileté krávy, pravděpodobně se před tím využívaly pro produkci mléka. Nálezy ostatků starších zvířat jsou rovněž provázeny nálezy ostatků telat starých 6–12 měsíců, tedy poražených zřejmě brzy po ostavení (Peške 1994). Předpokládá se, že první plemena domestikovaného skotu se podobaly např. dnešním africkým plemenům v tom smyslu, že krávy mohou být dojeny jen za přítomnosti telat, která vzbuzují v samici tzv. vydojovací (ejekční) reflex (Černý 2006). Větší počet těchto kosterních nálezů svědčících o mléčném hospodářství je právě z dob eneolitu (Balasse and Tresset 2002; Peške 1994). Avšak existují i starší nálezy, např. z Předního východu z období až před 10 500 lety, jež ukazují na využití koz jak pro maso, tak pro mléko (Gerbault et al. 2013; Vigne 2008; Vigne and Helmer 2007). Doklady skotu využívaného pro mléko již v neolitu byly rovněž objeveny ve Francii (Balasse and Tresset 2002).

Nejpřesvědčivější doklady o tom, že mléčné hospodářství bylo praktikováno již před eneolitem, poskytla pravěká keramika. Rezidua mastných kyselin a mléčného tuku

byla nalezena na keramice staré 7 000–8 500 let pocházející z několika nalezišť v severozápadní Anatolii (Evershed et al. 2008). Co se týče Evropy, nejstarší nálezy máme z dnešního Rumunska a Maďarska, kde bylo uchování mléka prokázáno na keramice staré 7 500–7 900 let (Craig et al. 2005). A rovněž i v Kujavě (oblast na severu Polska) byly nalezeny nádoby, jejichž stáří je odhadováno na 7 300–7 400 a 6 800–6 900 let, na nichž byla identifikována rezidua mléčného tuku. Protože byly nádoby proděravělé, usuzuje se, že mohly sloužit k výrobě sýra (Salque et al. 2013). Také nálezy na keramice z Britských ostrovů ukazují, že zde lidé mléčné hospodářství provozovali již před více než 6 000 lety a že sem pravděpodobně tato znalost přišla již s prvními zemědělci (Copley et al. 2003).

Co se týče našeho území, podle archeozoologické studie z nalezišť ve středních Čechách můžeme předpokládat, že chov dobytka, ovcí a koz pro mléčnou produkci pobíhal již před 6 800–7 700 lety, v období tzv. kultury s lineární keramikou (LBK *Lienarbandkeramik*) – nejstarší středoevropské neolitické kultury (Kovačiková et al. 2012; Zápotocká 2007). Rovněž analýza keramiky ze západočeských nalezišť potvrdila používání kravského a kozího mléka již v neolitu (Čiperová et al. 2015). Archeozoologické doklady z období eneolitu z českých a moravských nalezišť (zhruba od období 6 300 let před současností) pak ukazují na vysoký podíl dospělých jedinců – ovcí, koz a hovězího dobytka, rovněž nasvědčují porážení telat po odstavení. Tato fakta, podpořena navíc převažujícími nálezy samic v dospělém věku, svědčí o využívání zvířat k sekundárním produktům – v tomto případě k mléčné produkci (Kyselý 2010).

Pro počátky neolitu v severní Africe, je typické, že zde pravděpodobně došlo k domestikaci zvířat mnohem dříve než k domestikaci rostlin a je možné že zde bylo i jedno z center domestikace hovězího dobytka (Gifford-Gonzalez and Hanotte 2011). Nejstarší mimoevropské důkazy o mléčném hospodářství pochází z naleziště Takarkori v jihozápadní Libyi. Podle reziduí mléčného tuku na střepech keramiky se předpokládá, že zde lidé provozovali mléčné hospodářství již v období před 5 800–7 200 lety (Dunne et al. 2012).

Jedna z novějších studií přišla se zajímavou metodou, jak zjistit, zda bylo v pravěku mléko dospělými lidmi skutečně konzumováno. Jedná se o detekci mléčného proteinu β -laktoglobulinu v zubním kameni z lidských ostatků. Autoři použili vzorky z několika lokalit Evropy, Asie a Afriky. β -laktoglobulin byl určen již u nejstarších

zkoumaných vzorků (5 000 let) z Evropy a z oblasti dnešní Arménie a jihozápadní části Ruska a jeho výskyt koreloval s dnešní četností LP (Warinner et al. 2014).

Další zajímavá data, jež by mohla poskytovat doklady o předchozích praktikách mléčného hospodářství, pochází z výzkumu variability genů kódujících mléčné proteiny u moderních plemen skotu. Výsledky ukazují, že původní plemena skotu ze severní Evropy mají v genech kódujících mléčné proteiny více nesynonymních mutací než ostatní zkoumaná plemena (dataset zahrnoval 70 plemen z Evropy a Turecka). Autoři předpokládají, že tyto změny jsou důsledkem selekce, jež mohla začít již v neolitu a vedla ke zvyšování obsahu tuků a proteinů v mléce. V oblasti severní Evropy tak zřejmě proběhla koevoluce lidí a zvířat, resp. genetických znaků souvisejících s konzumací mléka (Beja-Pereira et al. 2003).

2.5.2 Pasterectví jako adaptace na aridní klima

Archeologické doklady ukazují, že vůbec první zemědělci patřili do tzv. kultury natúfienu, ta se vyvinula v oblasti Levanty před 10 000–13 000 lety. Lidé této archeologické kultury byli usedlými lovci-sběrači, kteří pravděpodobně jako první začali pěstovat rostliny (Bar-Yosef 1998). K domestikaci ovcí, koz, hovězího dobytka a prasat zřejmě došlo o něco později, zhruba od období před 10 500 lety (Vigne 2011).

V Africe a v Arábii měl však neolit docela jiný průběh. Pasterectví se zde rozšířilo za absence pěstování rostlin. První doklady pravděpodobně domestikovaného či alespoň chovaného či hlídaného hovězího dobytka v Africe pochází z období před 8 000–9 000 lety z východní Sahary, první známky o pěstování rostlin jsou zhruba 7 000 let staré a pochází z údolí Nilu (Marshall and Hildebrand 2002). Důvodem byly zřejmě přírodní podmínky. Velká část severovýchodní Afriky včetně Sahary byla před 12 000 lety spíše savanou než pouští, mluví se o tzv. zelené Sahaře (Cílek and Pokorný 2016).

Savana je i v dnešní Africe nejrozšířenějším biotem. Rozkládá se od jižního okraje sahelu až po kapskou oblast, s výjimkou konžské pánve a horských oblastí na východě Afriky a pouštních oblastí na jihu Afriky. Je specifická tím, že se udržuje svou sezonností, tedy zjednodušeně řečeno suchá období brání tomu, aby se z ní stal les, zatímco období dešťů brání její přeměně v poušť. Pro stabilitu tohoto prostředí jsou

klíčové rovněž požáry, které zabraňují postupnou přeměnu savany v les, svou roli sehrává také skladba zvěře, resp. okusovačů, spásačů a predátorů (Storch 2016).

Během vlhčího období staršího a středního holocénu, panovaly v oblasti dnešní Sahary podmínky ne nepodobné výše popsané savaně s dostatkem divoké zvěře, kterou využívali místní lovci-sběrači (Drake et al. 2011). A patně někdy v tomto období sem začali pronikat i první pastevci (Jesse et al. 2013). Před 5 500–6 500 lety došlo k ale výraznému vysušení a zhruba před 2 500 lety se aridní prostředí Sahary podobalo tomu dnešnímu (Cílek and Pokorný 2016; Sůvová 2016). Vysychající savana se tak pro lovce-sběrače a pastevence stávala stále více nepředvídatelným prostředím díky nepravidelnosti srážek a tím pádem i zdrojů obživy (Serenó et al. 2008).

Otázkou zůstává, zda bylo v Africe samostatné domestikací centrum hovězího dobytka a zda zde mohla domestikace vypadat tak, že lovci sběrači přešli z toho, že stáda dobytka nejdříve jen sledovali a lovili, k domestikaci a nomádskému pastevectví (Marshall and Hildebrand 2002). Nicméně před 4 000–5 000 lety bylo pravděpodobně pastevectví, kombinované se sběrem a lovem, úspěšnou subsistencí v oblasti dnešního sahelu, kam se pravěcí pastevci vzhledem k šíření pouště stáhli (Gifford-Gonzalez and Hanotte 2011).

Pastevci jsou definováni jako lidé primárně závislí na produktech získaných od domácích zvířat (z řádu sudo- a lichokopytníků). Pastevence bychom mohli rozdělit také na agro-pastevence neboli smíšené zemědělce, jež kombinují pěstování rostlin a chov zvířat a čisté pastevence, kteří jsou závislí pouze na produktech svých zvířat. Nicméně i tito čisté pastevci směňují produkty získané od svých zvířat s produkty usedlých zemědělců-pěstitelů a často i s lovci sběrači (Gifford-Gonzalez 2005).

I v dnešní době je v oblastech jako je sahel a dalších místech, které mají jen sezónní přísun srážek, nomádské pastevectví stále rozšířeno. A stále se jedná o velmi výhodné využívání zdrojů takovýchto oblastí. Příkladem může být studie, ve které bylo zjištěno, že děti nomádsky žijících Tuaregů (chudých i bohatých) jsou lépe živeny než děti usedlých zemědělců ze stejné oblasti, nejhůře pak dopadly děti druhotně sedentarizovaných Tuaregů. Zdá se tedy, že nomádi jsou schopni v těch nejsušších oblastech čelit nehostinnému klimatu lépe než usedlí zemědělci (Pedersen and Benjaminsen 2008).

V suchých a stepních oblastech se stává nevýhodnějším využívat zvířata, bez toho aby byla usmrcena. Slouží k produkci mléka, případně je konzumována i krev a pastevci tak získávají tekutiny a živiny i v obdobích sucha, bez toho, aby zhoršili udržitelnost stáda (Gifford-Gonzalez and Hanotte 2011). Pastevci zde migrují primárně pro to, aby zajistili celoroční obživu a vodu svým stádům, tyto migrace mohou probíhat podle různých vzorců. Přesuny bývají rovněž ovlivněny i snahou pastevců vyhnout se obtížnému hmyzu a nebezpečí nákazy dobytka nemocemi. Svou roli pak často sehrávají i politické a ekonomické faktory, např. státní hranice, vyhnutí se placení daní, či ochota usedlých zemědělců pronajímat svou půdu k pastvě (Dysonhudson and Dysonhudson 1980). V obdobích sucha mohou např. spory o vodní zdroje mezi pastevci a usedlými zemědělci vygradovat až v příčinu občanské války, čehož je příkladem např. nedávný konflikt v súdánské oblasti Dárfúr (Cílek 2016).

Nejefektivnějším využitím krajiny s nízkým úhrnem srážek a dlouhým obdobím sucha tedy je nomádské pastevectví, kdy se lidé v zájmu zajištění celoroční obživy svým stádům přemisťují a využívají sezónní pastviny (Dysonhudson and Dysonhudson 1980). Mluvíme tak o extenzivním využití krajiny nebo také transhumacích, tedy periodických migracích do sezónních stanovišť. V sahelo-súdánském pásmu jde o transhumace horizontální (plošné), jinde pak vertikální (v závislosti na nadmořské výšce), např. pastevci v Íránu. Ukazuje se, že znalosti o chování pastevců jsou důležité např. pro prevenci šíření některých infekčních chorob (Xiao et al. 2015).

2.6 Molekulární signály pozitivní selekce pro laktázovou persistenci

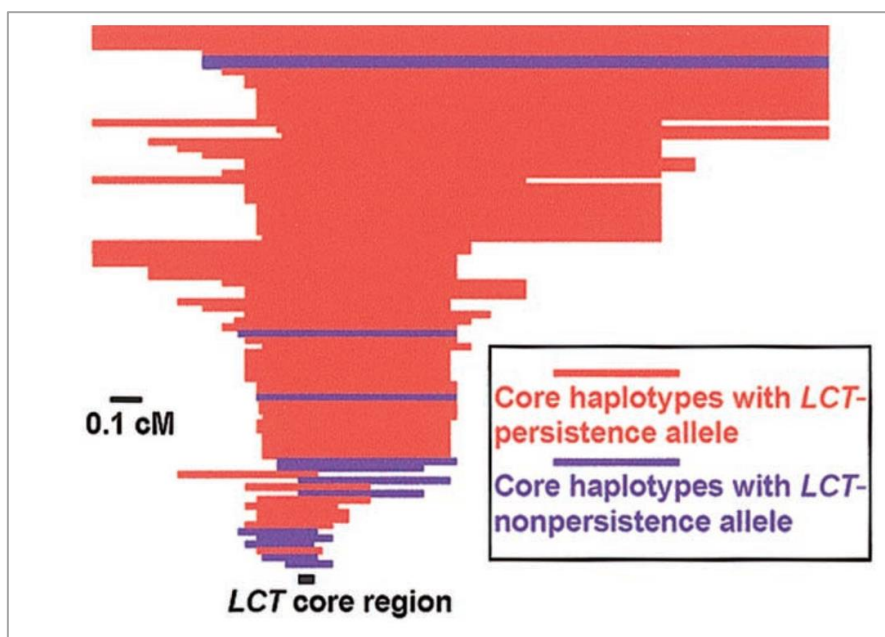
Předpokládá se, že vysoké frekvence výskytu LP u některých populací musely být podmíněny tím, že schopnost pití mléka v dospělosti přinášela daným jedincům výhodu a zvyšovala jejich reprodukční zdatnost. Jinými slovy, že tento znak byl pod vlivem pozitivní selekce. Následující kapitola by měla demonstrovat, jak analýzy genetické diverzity molekulárního pozadí LP zaměřené na výzkum selekční neutrality tento předpoklad skutečně potvrzují.

Ještě před tím, než byly známy jednotlivé pro-LP mutace (Harvey et al. 1998; Hollox et al. 2001) bylo v rámci zhruba 60 kb *LCT* genu a 5 kb *upstream* analyzováno

11 polymorfních míst. Pro mimo-africké populace bylo identifikováno 50 hlavních haplotypů (haplotypem označujeme specifickou kombinaci alel), přičemž čtyři nejčastější byly označeny písmeny A, B, C a U. Bylo zjištěno, že nejfrekventovanější haplotyp v severní Evropě (A) je asociován s LP. Autoři to interpretovali jako výsledek genetického driftu a silné pozitivní selekce. U afrických populací byla pak zjištěna mnohem vyšší haplotypová diverzita. Například čtyři nejčastější haplotypy A, B, C a U včetně jejich odvozenin tvoří 89 % mimo-africké haplotypové diverzity, ale jen 51 % subsaharských haplotypů (Harvey et al. 1998; Hollox et al. 2001; Ingram et al. 2009a).

O něco později byl identifikován výskyt alely -13910^*T výhradně v rámci haplotypu A a na základě analýzy 18 SNP v okolí určen region zhruba o velikosti 1 Mb, jež je ve vazebné nerovnováze (Poulter et al. 2003). Vazebná nerovnováha znamená, že zastoupení jednotlivých genotypů v populaci neodpovídá jejich teoretické četnosti (Flegr 2009). Příčin může být několik, jednou z nich je pozitivní selekce. Při pohlavním rozmnožování totiž dochází v meióze k rekombinacím mezi chromozomy a do další generace jsou přenášeny nové haplotypy. Pokud se v genomu vyskytne výhodná alela, šíří se rychle v dalších generacích a s touto výhodnou alelou může být přenášen i okolní haplotyp – jedná se vlastně o tzv. evoluční svezení se (*genetic hitchhiking*) (Jobling et al. 2013). Selektce se projeví tzv. evolučním vymetením (*selective sweep*) tedy snížením genetické variability v okolí výhodné mutace (Flegr 2009; Jobling et al. 2013). Výsledným stavem je pak relativně dlouhý haplotyp, jež mutaci obklopuje.

Ve studii Bersaglieri et al. 2004 bylo zkoumáno více než 100 SNP v okolí -13910^*T a u evropských nositelů této mutace byla určena délka okolního haplotypu na více než 1 Mb. Konkrétně u souboru Američanů s evropským původem byl nalezen z velké části identický haplotyp dlouhý více než 800 kb – viz Obrázek 12. Pozitivní selekce zde byla prokázána třemi různými metodami (F_{ST} , p_{excess} , a REHH – *relative extended haplotype homozygosity*) (Bersaglieri et al. 2004).



Obrázek 12: Znárodnění haplotypů v okolí LP alely na základě dat z populace Američanů evropského původu. Černě je znázorněn centrální blok s pozicí C/T-13910, červeně pak haplotypy s -13910^*T a fialově haplotypy s -13910^*C . Vzdálenosti jsou v centimorganech. Je patrná dlouhá identická oblast v okolí -13910^*T (Bersaglieri et al. 2004).

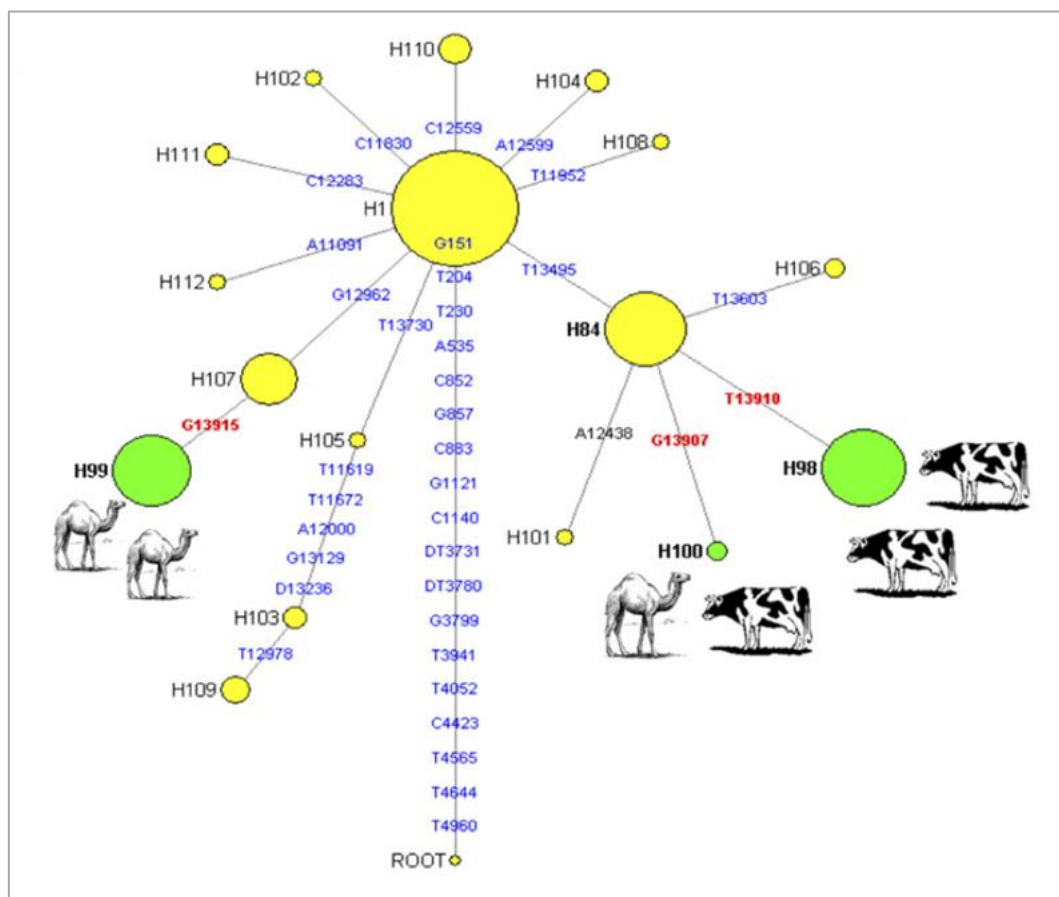
Haplotypové zkoumání -13910^*T u populace afrických Fulbů z Kamerunu rovněž prokázalo > 1 Mb dlouhý haplotyp. Vyšlo rovněž najevo, že Fulbové a Arabové Baggara z Kamerunu a Bulalové z Čadu sdílí haplotypové pozadí -13910^*T s evropskými populacemi zatímco okolní haplotyp u alžírských berberů (Mozabité) odpovídá tomu, který byl objeven u populací střední Asie (Ranciaro et al. 2014).

Pozitivní selekce díky dlouhé oblasti haplotypové homozygotity byla určena i pro alelu -14010^*C a sice na základě dat od populací z Keni, Tanzanie a Súdánu. Zde bylo analyzováno 123 SNP na úseku delším než 3 Mb v okolí alely -14010^*C . Haplotyp sdílený výše uvedenými populacemi byl více než 2 Mb dlouhý (Tishkoff et al. 2007).

Selekce byla prokázána i pro -13915^*G u saúdských Arabů. Na základě analýzy 18 SNP a jedné inzerce v rámci 2,2 Mb dlouhého úseku v jejím okolí byl identifikován 1,3 Mb dlouhý sdílený haplotyp. Díky analýze haplotypů v okolí dalších pro-LP mutací u souboru jež obsahoval vzorky z celého světa, včetně uvedených saúdsko-arabských, se ukázalo, že mutace -13907^*G sdílí stejný haplotypový základ s -13910^*T zatímco -13915^*G se od nich svým haplotypovým pozadím odlišuje (Obrázek 13). Autoři se

domnívají, že varianty -13907^*G a -13910^*T by se mohly rozšířit v souvislosti s domestikací skotu, zatímco rozšíření -13915^*G souvisí s domestikací velblouda (Enattah et al. 2008).

Výsledky ukazující na pozitivní selekci haplotypu v okolí -13915^*G byly nedávno rovněž potvrzeny analýzou vzorků z Ománu a Jemenu (Bayoumi et al. 2016).



Obrázek 13: Haplotypová síť vytvořená na základě analýzy 26 SNP v úseku 3128 bp v rámci intronu 13 genu *MCM6*. Analyzováno bylo 170 jedinců z 13 populací z celého světa. Modře jsou uvedeny pozice mutací, černě čísla haplotypů, červeně pro-LP mutace, žlutě vybarvené kruhy – haplotypy bez pro-LP mutace, zeleně haplotypy s pro-LP mutací. Haplotyp s mutací -13910^*T (H98) a haplotyp -13907^*G (H100), vychází ze stejného haplotypu bez pro-LP mutace (H84), zatímco -13915^*G (H99) má odlišný výchozí haplotyp (H107) (Enattah et al. 2008).

U etiopských Amharů, Oromů, Tigerejců, Wolajitů a smíšeného souboru Etiopanů bylo nalezeno všech pět pro-LP variant (Jones et al. 2015). Autoři této studie dále zkoumali dva regiony (500 bp úsek 16 kb *upstream* a 361 bp úsek 13 kb *downstream* od oblasti s pro-LP mutacemi) u osob s a bez LP. Ukázalo, že u osob s LP

byla genetická diverzita ve zkoumaných lokusech vyšší než u osob bez LP, což kontrastuje dřívějšími s poznatky o –13910*T a –14010*C. Autoři to interpretují jako měkké selekční vymetení (*soft selective sweep*), jedná o současné zvýšení frekvence různých alel (a okolních haplotypů), jež zodpovídají za stejný znak, tedy za LP (Jones et al. 2013). Pokud totiž na počátku existuje více ancestrálních haplotypů obklopujících výhodnou mutaci, selekce působí paralelně na všechny, a nenacházíme tak homogenní okolí mutace jako běžného selekčního vymetení (Pennings and Hermisson 2006).

Diverzita haplotypu v okolí zkoumané mutace se může stát nástrojem pro datování mutace (Slatkin and Rannala 2000). Předpokladem je, že objeví-li se nová mutace v populaci, její okolní haplotyp není diverzifikovaný. Zvýší-li se frekvence alely v populaci, okolní haplotyp začne být diverzifikován rekombinacemi a novými mutacemi. Míra naakumulované diverzity v určitém haplotypu pak může odpovídat jeho stáří (Jobling et al. 2013). Jak bylo uvedeno výše v případě rychlého nárůstu frekvence mutace v populaci díky pozitivní selekci, lze v okolí výhodné mutace pozorovat oblast vazebné nerovnováhy. Jedná se o oblast haplotypové homozygosity (*extended haplotype homzygosity* – EHH), která se postupem času díky dalším rekombinacím a novým mutacím, rozpadá. Na základě frekvencí haplotypů s EHH v dané populaci se tak dá odhadnout stáří mutace, resp. haplotypu obklopujícího výhodnou mutaci (Sabeti et al. 2002; Tishkoff et al. 2007).

Informace zjištěné o okolních haplotypech pro-LP mutací byly rovněž v několika studiích využity k odhadu stáří jednotlivých mutací. Pro přehled výsledků a použitých metod viz Tabulka 4.

Tabulka 4: Odhad stáří pro-LP mutací podle různých studií

<i>pro-LP mutace</i>	<i>odhad věku mutace (let před současností)</i>	<i>lokalita vzorkování</i>	<i>reference</i>	<i>použité metody</i>
-13910*T	2 188–20 650	Evropa (Američané evropského původu)*	(Bersaglieri et al. 2004)	Analýza rozpadu oblasti vazebné nerovnováhy**
	1 625–3 118	Skandinávie		
-13910*T	7 500–12 500	Portugalsko, Itálie, Kamerun (Fulbové), Svatý Tomáš a Princův ostrov	(Coelho et al. 2005)	ASD, Simulace vycházející ze snížení četnosti modální (asociované) alely s mutací
-14010*C	2 700–6 800	Keňa, Tanzanie, Súdán	(Tishkoff et al. 2007)	Simulace koalescence v rámci modelu zahrnujícího selekci a rekombinace
-13910*T	8 000–9 000	Evropa (Američané evropského původu)*		
-13915*G	6 140–2 050	Saudská Arábie	(Enattah et al. 2008)	Analýza rozpadu oblasti vazebné nerovnováhy**, ASD, ρ statistika
-13910*T	7 200–12 100	Uzbekistán (Uzbekové, Tádžikové)	(Heyer et al. 2011)	Spojený odhad věku alely a rychlosti růstu
	5 800–9 900	Uzbekistán (Kazaši)		
-13915*G	5 000–4 300	Jemen	(Bayoumi et al. 2016)	Analýza rozpadu oblasti vazebné nerovnováhy**
	2 400–2 200	Omán (Zúfarští Ománci)		

ASD *average square distance method*, metoda průměrných čtvercových vzdáleností – program Ytime (Behar et al. 2003); *Populace z projektu 1000 Genomes – CEU (Auton et al. 2015); **Uměle vytvořený název pro různé přístupy založené na obdobném principu, ve studiích pod názvy: *Decay of haplotype* (Bersaglieri et al. 2004), *Lincage disequilibrium decay* (Enattah et al. 2008), *Extended haplotype homozygosity decay* (Bayoumi et al. 2016)

2.7 Hypotézy vzniku a rozšíření laktázové persistence

Dnešní rozšíření LP zhruba u jedné třetiny světové populace je zřejmě výsledkem působení pozitivní selekce. Ta však nemohla probíhat dříve, než se lidé začali věnovat mléčnému hospodářství a konzumaci mléka. Avšak jaká byla skutečná příčina výhody pití čerstvého mléka? LP není rozšířena rovnoměrně a nalézáme ji u populací žijících ve velmi odlišných klimatických podmínkách s odlišnou subsistencí. Existují tři základní

hypotézy vysvětlující důvody tohoto jevu: kulturně-historická hypotéza, hypotéza o zvýšení příjmu vápníku v oblastech s nedostatkem slunečního záření a hypotéza o LP v aridních oblastech.

Kulturně-historická hypotéza předpokládá, že k selekci došlo v populacích chovatelů dobytka, zejména pastevců, kde byla LP pozitivně selektována díky možnosti zvýšení energetického příjmu právě konzumací čerstvého mléka (Holden and Mace 2002). Pastevci mají obvykle velká stáda krav poskytujících dostatek mléka a je tedy nasnadě, aby zde vznikla mutace, která bude tento zdroj energie využívat. Zbylé dvě hypotézy berou v potaz kromě kulturních návyků rovněž vliv prostředí. Zvýšení příjmu vápníku může být výhodné v oblastech s nízkým slunečním osvětlením, kde lidé syntetizují méně vitamínu D₃ z kožních prekurzorů. Tento vitamín je potřebný pro absorpci vápníku v kostech, přirozenou imunitu nebo vývoj pankreatu a jeho nedostatek způsobuje u dětí křivici a u dospělých osteomalacii, přičemž následkem těchto poruch mohou být např. porody rizikovější. Touto hypotézou by se tedy dalo vysvětlit rozšíření LP na evropském kontinentu, kde byl prokázán klesající gradient frekvencí výskytu LP ze severu na jih. Lidé v severních zeměpisných šířkách mohli skutečně vlivem nedostatečného slunečního osvětlení trpět avitaminózou vitamínu D. Schopnost přijímat větší množství mléka, jakožto alternativního zdroje vápníku, tak zde může být výhodná a rovněž může zvýšit šanci mít potomky (Flatz and Rotthauwe 1973). Další hypotéza se pokouší vysvětlit, proč je LP rozšířena u pastevců aridních oblastí. Pro populace žijící nomádkým stylem života v pouštních a polopouštních oblastech může být LP výhodná proto, že se jim mléko stane nejen zdrojem kalorií ale i vody (Cook and al-Torki 1975).

2.7.1 Kulturně-historická hypotéza

Souvislosti LP a mléčného hospodářství si všimli již v 70. letech minulého století Frederick J. Simoons a Robert D. McCracken a na základě porovnání výskytu fenotypu LP a mléčné produkce u různých populací zformulovali tzv. kulturně-historickou hypotézu. Podle této teorie se fenotyp LP vyseletoval jen v populacích, které provozovaly či provozují mléčné hospodářství a tradičně konzumují čerstvé mléko (nikoli mléčné produkty, v nichž je laktóza odstraněna fermentací) (McCracken 1971; Simoons 1970). R. D. McCracken vyslovil dokonce myšlenku, že fenotyp LP by mohl

být původní a jen ty populace, které mohly trávit mléčný cukr v dospělosti, začaly praktikovat mléčné hospodářství, avšak další data tuto teorii nepotvrdila (Leonardi et al. 2012; McCracken 1971).

Později byl vytvořen stochastický model genově-kulturní koevoluce (Aoki 1986). Byly zde definovány dva biologické fenotypy – LP (laktázová persistence) a LNP (laktázová ne-persistence) a dva kulturní fenotypy – konzument a ne-konzument mléka. Předpokladem bylo, že po čase bude frekvence jedinců s LP fenotypem odpovídat fixování kulturního zvyku pití mléka (při panmiktické populaci, přenosu kulturních návyků z rodičů na děti a počáteční efektivní velikosti populace 100 jedinců, pak nebyly zahrnuty některé další proměnné, například migrace). Přestože výsledkem bylo, že tyto dvě proměnné korelovaly jen částečně, autor studie uvádí, že to nemusí být přímo v rozporu s kulturně-historickou hypotézou. Výsledky modelu mohou podporovat předpoklad, že existují konzumenti mléka, kteří nemají LP a naopak (Aoki 1986; Leonardi et al. 2012).

Asociaci mezi pastevečtvím a LP rovněž potvrzují výsledky analýzy ve studii Holden and Mace 1997. Pro studii byly vytvořeny fylogenetické stromy sestávající z 62 populací celého světa na základě jazykové a genetické variability, u nichž byl známý status LP a závislost na pastevečtví (pro představu, například u beduínů byla uvedena >50% závislost na pastevečtví, u Čechů 30–50% a Maďarů <30% (Holden and Mace 2002)). Dále pak bylo testováno, jak spolu souvisí pastevečtví, množství srážek a počet suchých měsíců během roku a míra slunečního záření. Ukázalo se, že pastevečtví vysvětluje většinu výskytu LP v dnešním světě. Nepotvrdila se souvislost zeměpisné šířky a LP ani aridního klimatu a LP. Praktikování pastevečtví v aridních lokalitách vysvětluje autorky studie tím, že pastevečtví je adaptací na nehostinné podmínky, v nichž nelze provozovat zemědělství (Holden and Mace 1997; Holden and Mace 2002).

2.7.2 Hypotéza zvýšení příjmu vápníku v oblastech s nedostatkem slunečního záření

Vitamin D se tvoří v kůži z prekurzoru 7-dehydrocholesterolu aktivací UVB zářením. Jeden z jeho dalších metabolitů kalcitriol (1,25-dihydroxycholekalCIFerol neboli vitamín

D₃) reguluje syntézu *CaBP* (*calcium binding protein*), který se účastní příjmu vápníku. Nedostatek vitamínu D se tedy může projevit nedostatečným vstřebáváním vápníku a s tím spojenými poruchami jako je křivice u dětí nebo osteomalacie u dospělých.

V roce 1973 přišli Gebhard Flatz a Hans W. Rotthauwe s hypotézou, že by se v oblastech s nedostatkem slunečního záření mohlo stát alternativním zdrojem vitamínu D a vápníku mléko a schopnost trávení laktózy zde zvýšit fitness jedince (Flatz and Rotthauwe 1973).

Vápník nemusí být přijímán jen za pomoci *CaBP*, ale i pomocí tzv. pasivní difuze mezibuněčnými prostory a podle některých prací může dokonce samotná laktóza zvyšovat vstřebávání vápníku intercelulární cestou. Jak tento proces funguje, však stále není jasné (Guéguen and Pointillart 2000; Lengemann et al. 1959). Další studie se však v odpovědi na otázku, zda laktóza pomáhá vstřebávat vápník, neshodují (Abrams et al. 2002; Zittermann et al. 2000). Jinak se na transportu vápníku zřejmě podílejí i mléčné proteiny – kaseiny a β -laktoglobulin. Mléko je tedy velmi dobrým zdrojem vápníku – 1 sklenice (244 g) kravského mléka obsahuje 297,5–310 mg, což je zhruba 37–40 % doporučené denní dávky (Pereira 2014). Mléko obsahuje rovněž i vitamín D, avšak jen malé množství, zhruba 0,1–0,8 $\mu\text{g}/\text{l}$ což je 2–10 % doporučené denní dávky (Walstra et al. 2006). Více vitamínu D se dá získat z potravin, jako jsou žlutky a tučné mořské ryby (Green et al. 2015).

Je tedy možné, že před-neolitičtí evropští lovci-sběrači žijící v oblastech s nižším UVB zářením mohli získávat vitamín D hlavně konzumací potravin, jako jsou vejce a mořské ryby. Studie radioizotopů v kostním kolagenu ukazují, že významnou součástí jídelníčku lovců-sběračů z Britských ostrovů a jižní Skandinávie tvořily mořské zdroje, zatímco usedlí zemědělci, i ti co žili v pobřežních oblastech, se živili spíše potravou získanou na souši. Problém s nedostatkem vitamínu D mohl nastat až po přijetí zemědělské technologie i pro to, že strava bohatá na vlákninu může vést ke snížení obsahu 25-hydroxivitamínu D₃ v krevní plasmě (Batchelor and Compston 1983; Gerbault et al. 2011; Richards et al. 2003).

Ve studii Gerbault et al. 2009 byla použita data od čtyř populací Blízkého východu a 22 populací Evropy. Pomocí počítačových simulací byly testovány dva modely šíření LP – kulturní a demickou difúzí, přičemž každý z těchto modelů byl testován pro konstantní selekci a selekci závislou na zeměpisné šířce. K tomu bylo

testováno ještě to, zda se mohla LP šířit rychleji u středoevropské neolitické populace LBK (předpokladem bylo, že lidé ve střední Evropě pili více nefermentovaného mléka, neboť se zde díky chladnějšímu klimatu skladovalo lépe než například ve Středomoří). Výsledkem bylo zamítnutí hypotézy o kontinuální selekci, přičemž nejlépe vyhovujícím modelem byla demická difúze se selekcí závislou na zeměpisné šířce. Vysoké frekvence LP v severní Evropě nemohly nastat stochastickými procesy jako je genetický drift, tedy výsledky hovoří pro hypotézu zvýšení příjmu vápníku. Autoři dále předpokládají, že na rozšiřování LP v Evropě měly významný vliv také migrace (Gerbault et al. 2011; Gerbault et al. 2009; Leonardi et al. 2012).

Na druhé straně, v jižní Evropě nalézáme sice nižší frekvence LP, avšak i zde existují oblasti kde je LP poměrně hojná. Například ve španělské v Galicii byla zjištěna u 66 % obyvatel, přičemž výskyt alely –13910*T je 37 % (Itan et al. 2010; Sverrisdóttir et al. 2014). Obyvatelé této oblasti netrpí nedostatkem slunečního záření a dá se tak předpokládat, že i vitamínu D mají dostatek (Sverrisdóttir et al. 2014). Alela –13910*T nebyla však identifikována ani u jednoho jedince ze 7 000 let starého neolitického naleziště v severovýchodním Španělsku (Lacan et al. 2011b; Sverrisdóttir et al. 2014). Podle počítačových simulací a dat ze současné a archaické mitochondriální DNA (mtDNA) se zdá, že zde nedošlo k populační výměně. Pro mutaci –13910*T zde byla prokázána pozitivní selekce a zamítnuta hypotéza genetického driftu. Pokud jsou tedy tyto výsledky správné, hovoří v neprospěch hypotézy o zvýšení příjmu vápníku jakožto příčiny LP v celé Evropě, respektive toho že se LP na severu Evropy hojně rozšířila a do zbytku Evropy se dostala genovým tokem. Pravděpodobně zde musel existovat další důvod pro rozšíření LP, jiný než nedostatek UVB záření či silný genový tok (Sverrisdóttir et al. 2014).

Budeme-li hledat nějaké paralely ze současnosti, můžeme narazit na kontroverzní výsledky. Jedna ze studií se zaměřila na vitamín D u nigerských Fulbů (Glew et al. 2010). Fulbové jsou tradičně pastevecký národ afrického sahelu. Běžně konzumují čerstvé kravské mléko a nalézáme u nich rovněž vysoké frekvence osob s LP. Autoři zmiňované studie analyzovali 22 fulbských mužů a 29 žen ve věku 18–72 let a zjistili, že 83 % žen a 45 % mužů trpí nedostatkem vitamínu D (Glew et al. 2010). Toto zjištění je poměrně překvapivé uvážíme-li, že pásmo afrického sahelu je více než dostatečně zásobeno slunečním zářením. Autoři nedostatek vitamínu D vysvětlují

kulturou oblékání, kdy si hlavně ženy tradičně zahalují většinu těla oděvem a rovněž tím, že tito pastevci nemají dostačený přístup k potravinám, v nichž je větší množství vitamínu D (Glew et al. 2010). Avšak to, zda by se u Fulbů vyskytovala ve vyšší míře křivice či osteomalacie nebylo zatím dostatečně prozkoumáno, rovněž není zodpovězena otázka, zda nahrazují případný nedostatek vitamínu D zvýšeným příjmem vápníku z mléka. Dřívější studie uvádí, že nigerští Fulbové obecně přijímají denně asi o 21 % méně vápníku než je norma pro populaci Spojených států amerických (Glew et al. 2001). Je tedy diskutabilní, zda tyto výsledky mohou nějak podpořit či zpochybnit zmiňovanou hypotézu, nebo zda se dvě tak odlišná životní prostředí jako je sahel a sever evropského kontinentu dají vůbec srovnávat. Rovněž je diskutabilní, zda se dají doporučené výživové hodnoty pro obyvatele Spojených států amerických aplikovat obecně na ostatní populace.

2.7.3 Hypotéza o LP v aridních oblastech

Další z teorií vysvětlující rozšíření LP pochází od Gordona C. Cooka a M.T. Al-Torkiho z roku 1975. Tito badatelé měřili fenotyp LP u dobrovolníků z Arabského poloostrova (beduínu, Saúdů a Jemenců) a zjistili, že většina probandů tráví mléčný cukr v dospělosti. Následně vyslovili hypotézu o významu suchého klimatu. Na Arabském poloostrově, žila skutečně část obyvatel po tisíce let kočovným způsobem života a pitná voda zde byla velmi vzácná, takže významnou složkou jídelníčku těchto lidí (zejména beduínů) tvořilo velbloudí mléko. To ostatně udávají i cestovatelé, kteří s beduíny trávili dlouhou dobu během karavanních cest (Thesiger 1959). Díky možnosti konzumaci mléka ve větším množství tak beduíni získali jak potřebnou tekutinu, tak i kalorie, takže selekční tlak pro LP zde mohl být velice silný. Autoři ve své hypotéze rovněž uvádějí, že osoby s LP mohly snáze čelit epidemiím a dehydrataci organismu při onemocněních jako je cholera, díky vstřebávání monosacharidů, jež je spojeno s absorpcí vody (Cook and al-Torki 1975). Teoreticky může glukóza vzniklá štěpením z laktózy stimulovat zpětné vstřebávání Na^+ do buněk Na^+ -glukózovým ko-transporterem a může tedy částečně napomáhat ustálení osmotické rovnováhy narušené bakterií *Vibrio cholerae*.

2.8 Šíření laktázové persistence v Evropě a výzkum aDNA

Evropa je nejlépe prostudovaným regionem především co se týče LP. Možná je to do jisté míry dáno také tím, že ve Skandinávii a na Britských ostrovech nacházíme jeden z celosvětově největších podílů LP osob. Evropa je rovněž místem, kam se ubíral jeden z nejstarších proudů neolitu z Předního východu.

Ve studii Itan et al. 2009 vytvořili autoři model šíření LP, mléčného hospodářství a dalších subsistenčních strategií v rámci Evropy a západní Asie. Byly sem zahrnuty tři kulturní skupiny – lovci-sběrači, zemědělci, jež neprovozují mléčné hospodářství a zemědělci, kteří mléčné hospodářství provozují a následně byly modelovány možné interakce mezi jednotlivými skupinami a genový tok. Předpokladem bylo, že se obě zemědělské skupiny dostávaly do Evropy od doby před 9 000 lety z Anatólie. Vstupními daty byl dnešní výskyt LP a archeologické doklady o prvních zemědělcích z dvanácti evropských lokalit. Cílem bylo zjistit, kde se nacházely nejstarší skupiny provozující mléčné hospodářství, u nichž se zároveň již vyskytovala –13910*T. Výsledkem byl časoprostorový odhad pozitivní selekce pro –13910*T – jednalo se o oblast mezi severním Balkánem a střední Evropou, kde selekce pro –13910*T podle uvedeného výzkumu začala před 6 256–8 683 lety. Autoři své výsledky dávají do souvislosti s LBK, jejíž počátky jsou datovány přibližně 7 500 let před současností a její místo původu by mělo být v oblasti dnešního severozápadního Maďarska a jihozápadního Slovenska (Itan et al. 2009).

Výsledky jsou v částečném rozporu studií Gerbault et al. 2009, kde autoři došli k závěru, že se vysoké selekční koeficienty pro LP u LBK by nestačily pro to, aby se LP rozšířila po Evropě do takových četností, jaké nalézáme dnes (Gerbault et al. 2009); podrobněji popsáno v kapitole 2.7.2. Je třeba ale poznamenat, že oba modely se v jistých ohledech liší – model ve studii Gerbault et al. 2009 nezahrnoval genový tok mezi sousedními populacemi, zatímco model ve studii Itan et al. 2009 neoperoval se změnami intenzity selekce v prostoru a čase (Gerbault et al. 2011; Gerbault et al. 2009; Itan et al. 2009; Leonardi et al. 2012). Ve studii Itan et al. 2009 tedy autoři na základě výsledků odhadují místo odkud se –13910*T začala šířit, zatímco ve studii Gerbault et al. 2009 byla potvrzena souvislost severních zeměpisných šířek se silou selekce pro LP.

Model ve studii Itan et al. 2009 vychází z toho, že alela –13910*T byla do Evropy zanesena zemědělci z Předního východu a autoři přepokládají, že by se měla

vykytovat i u prvních evropských zemědělců včetně LBK (Itan et al. 2009). Model ve studii Gerbault et al. 2009 pak předpokládá, že by se –13910*T měla v Evropě vyskytovat ve velmi nízké frekvenci (1 %) už před obdobím neolitu.

Bylo provedeno několik studií, jež zjišťovaly výskyt –13910*T v kosterních pozůstatcích z mezolitických a neolitických nalezišť. Analýza archaické DNA (aDNA) je velice komplikovaná a finančně náročná, proto je obvykle zkoumaný populační vzorek malý. Výsledky však ukazují na absenci –13910*T u nejstarších neolitických evropských populací. Odvozená alela zajišťující dnes LP –13910*T nebyla detekována ani u jednoho z tří jedinců z neolitického naleziště Derenburg (dnešní severozápad Německa), ani u tří jedinců ze Szarvas (jihozápad Maďarska) a ani u dvou jedinců Kretuonas (východní Litva), stáří vzorků je odhadováno na 7 000–8 000 tisíc let (Burger et al. 2007). Rovněž se nenašla u žádného ze sedmi jedinců ze 7 000 let starého neolitického naleziště v jeskyni Avellaner (severovýchodní Španělsko) (Lacan et al. 2011b) a ani u jednoho z 26 jedinců z neolitického naleziště Treilles (jihozápadní Francie) z období zhruba před 5 000 lety (Lacan et al. 2011a). Absence –13910*T byla zjištěna i u devíti vzorků z 6 000–8 000 let starých nalezišť ve Velké dunajské kotlině (Maďarsko) (Gamba et al. 2014).

Ve studii Witas et al. 2015 byla získána data pokrývající 250 generací z 6 000 let trvajícího období od středního neolitu až po středověk z nalezišť v polském Kujavsku, kde analýza HVS-1 potvrdila kontinuitu osídlení. Alela –13910*T nebyla nalezena ani u jedné z devíti neolitických koster starých 4 500–6 500 let. Ve vzorcích spadajících do halštatské kultury, což je období pozdní doby bronzové/rané doby železné před 2 600–2 800 lety byla –13910*T objevena jen u dvou jedinců z osmi, tedy ve frekvenci 19 % a dále ve 36 % u souboru 34 jedinců z doby římské (1 700–1 800 let před současností). U 80 středověkých vzorků (600–1 000 starých) byl pak výskyt této alely 20–64 %, podíl LP osob tedy mohl dosahovat až 86 %, což je dokonce více než u současné populace tohoto regionu – až 43 % (Witas et al. 2015).

Co se týče dalších evropských nalezišť, zatím nejstarší jedinci, u kterých byla –13910*T identifikována, pochází z dnešního Baskicka. Z dvaceti šesti vzorků, patřících do období pozdního neolitu – zhruba 4 000–5 000 před současností, mělo mutaci –13910*T sedm, z toho dva byli heterozygoti, frekvence alely byla 23 % (Plantinga et al. 2012). Jeden heterozygot z deseti zkoumaných vzorků byl rovněž

objeven u nálezů ze švédského ostrova Gotland starých 4 300–5 400 let, frekvence –13910*T by zde mohla být 5 % (Malmström et al. 2010). Analýza 18 vzorků ze středověkého naleziště Dalheim (12. století n. l) pak potvrzuje výsledky polského týmu Henrika W. Witase, který určil nevyšší výskyt LP u středověkých vzorků, frekvence alely –13910*T zde dosahovala 50 % a výskyt LP mohl být až 72 % (Kruttl et al. 2014).

Na základě uvedených faktů přišli autoři studie Witas et al. 2015 s alternativní teorií šíření LP v Evropě. Protože alela –13910*T nebyla nalezena u neolitických koster z Maďarska ani Polska, zřejmě sem nebyla zanesena z Předního východu neolitickým proudem postupujícím z Anatólie přes Řecko a dále na sever. A přestože zemědělci v období LBK již provozovali mléčné hospodářství, nemuseli nést alelu –13910*T. Na základě výsledků z Baskicka a Gotlandu je pak možné že –13910*T byla do Evropy zanesena přes Gibraltar a v období pozdního neolitu před 3 000–5 000 lety se šířila z Baskicka přes Francii dále na severovýchod. Tato hypotéza však stojí na velmi malém množství dat a pro její ověření bude třeba dalších analýz (Witas et al. 2015).

3 Vlastní práce a výsledky:

laktázová persistence v Arábii a u afrických Arabů

3.1 Historické pozadí

3.1.1 Jižní Arábie od neolitu po rozpad karavanních království

Jedním z neolitických proudů z Předního východu, provázeným migrací, proniklo zemědělství i do jižní Arábie (Drechsler 2007). Neolitická naleziště v jižní Arábii nejsou početná, avšak zdá se, že následný vývoj neolitu zde probíhal nezávisle. (Uerpmann et al. 2009; Černý 2016). Pasterectví tu pravděpodobně přecházelo pěstování rostlin stejně tak, jak tomu bylo v Africe. Skalní malby a kosterní nálezy ukazují na možnou přítomnost domestikovaných zvířat (především ovcí a koz) již před 9 000 lety. Přestože byl v Arábii přítomen divoký tur, je málo pravděpodobné, že zde bylo zvláštní centrum jeho domestikace (McCorriston and Martin 2009). Již domestikovaný skot se sem zřejmě dostal z oblasti Levanty či z Afriky (Uerpmann et al. 2009). Rozsáhlejší doklady o domestikovaném skotu pak pochází z období před 8 000 lety (McCorriston and Martin 2009). Co se, týče rostlin, první známky o pěstování pšenice jsou až pozdější, z doby před 5 000 lety (Fedele 2009; Černý 2016).

Specifický je pak průběh neolitu v oblasti Hadramawt (východní Jemen). O významu hovězího dobytka mohou svědčit 6 400 let staré pozůstatky dobytčí oběti z naleziště Chašija, které bylo interpretováno jako pozůstatek rituálních hostin konaných za účelem vymezení pasterectvých teritorií (McCorriston and Martin 2009). V období zhruba před 6 000 lety došlo ke klimatickým změnám, díky kterým pastviny postupně vysychaly. Tehdejší pasterectvi se tudíž začali soustřeďovat na menších územích, založili zavodňovací systémy, z oblasti Wádí Siná (východní Jemen) jsou doklady staré 5 000 let. Ty původně pravděpodobně sloužily k zavlažování pastvin, časem však lidé přešli k pěstování rostlin a zavlažovací systémy využívaly k tomuto účelu. Tyto změny vedly k postupnému rozdělení obyvatelstva na nomádské pasterectve a usedlé zemědělce (Harrower 2008; Černý 2016). Neolitická společnost jižní Arábie nebyla však diferenciována jen na pasterectve a pěstitele rostlin, ale přetrvávali i lovecko-sběračské praktiky. Svědčí o tom nálezy z oblasti jemenské Tihámy (přímořská oblast na západě Arabského poloostrova). V lokalitě Wádí ath-Thajjila byla nalezena vesnice, jejíž

obyvatelé chovali hovězí dobytek, zatímco o něco dál se nacházelo stanoviště lovců-sběračů. Pro tuto pobřežní oblast byla rovněž typická konzumace mořských živočichů, o čemž svědčí velké množství nalezených schránek měkkýšů (Černý 2016).

V době bronzové, v jižní Arábii 3 000–5 000 let před současností, zde došlo k většímu rozmachu zemědělství, díky zavlažovacím systémům se zintenzivnilo pěstování rostlin jako je ječmen, pšenice ale i čirok či proso a v menší míře rovněž ovoce a luštěniny či len. Ke konci tohoto období se začíná rozvíjet obchod s aromatickými pryskyřicemi. V období před 1 000–3 000 lety pak v jižní Arábii vznikly státní celky, jež nazýváme karavanní království, a jejichž hlavní zdroj příjmů byl právě z obchodování aromatickými pryskyřicemi (kadidlem a myrhou). Ty byly dováženy do Středomoří, odkud jihoarabští obchodníci získávali na oplátku zboží jako olej a víno (Černý 2016).

K přepravě zboží přes pouštní oblasti Arabského poloostrova byl využíván velbloud jednohrbý – dromedár, avšak kde a kdy došlo k jeho domestikaci je stále nezodpovězeno. Z nalezišť Tell Abraq a Muwaylah (východ Spojených arabských emirátů) pochází ostatky domestikovaných velbloudů staré 2 500–3 000 let (Uerpmann and Uerpmann 2002). Ještě starší ostatky, z doby před 7 000 lety pocházejí z naleziště u Abu Zabí, avšak u těch není jasné, zda se jednalo o domestikanty či ulovená zvířata (Beech et al. 2008). Avšak zdá se, že jihovýchodní Arábie nebyla centrem domestikace velblouda jednohrbého (Uerpmann and Uerpmann 2002). Genetické analýzy mtDNA 1 083 současných dromedárů převážně z Arábie a Afriky ukazují na obdobnou genetickou diverzitu napříč různými oblastmi (jižní Arábie, severní Arábie, severní a západní Afrika a východní Afrika), nebyl objeven žádný fylogeografický vzorec umožňující určit zdrojovou populaci. Naproti tomu jaderná DNA ukazuje na odlišnosti východoafrické populace od těch ostatních, zdá se, že tato se po introdukci velbloudů do Afriky (možná již před 3 000 tis. lety) vyvíjela samostatně (Almathen et al. 2016).

Život arabských pastevců velbloudů byl úzce spojen se vzestupem jihoarabských karavanních království a obchodem se středomořskými civilizacemi. Díky domestikaci velblouda se pastevci tohoto obchodování aktivně účastnili (Retsö 1991). Za pomoci tohoto zvířete byli schopni přepravovat zboží přes nehostinné pouštní oblasti centrální Arábie. Rozvoj karavanních království začal stagnovat někdy v 6. století, kdy byly

obchodní trasy odkloněny z Rudého moře do Perského zálivu a v následujícím období se rovněž začíná šířit islám (Černý 2016).

3.1.2 Migrace z Arábie do Afriky

Část pastevců velbloudů, jež se účastnila na obchodování s vonnými pryskyřicemi, přišla po rozpadu karavanních království o svou obživu a byla nucena hledat nové příležitosti mimo Arábii např. v sousední Africe. Šíření Arabů do Afriky bylo od 7. století n. l. spojeno rovněž se šířením islámu. (Levy and Holl 2002). Nejprve vstoupili Arabové do Egypta a odtud pokračovali dvěma různými cestami. První sledovala údolí Nilu směrem na jih, avšak zde byl jejich postup na několik století pozastaven křesťanskými královstvími v Núbii. Teprve na počátku 14. století n. l. dobyli Mamlúkové (islámští bojovníci) núbijské město Dongola (dnešní Súdán) a arabští pastevci mohli pokračovat dál do nitra Afriky podél Modrého a Bílého Nilu a rovněž na západ do Čadské pánve. Z historických pramenů je známo, že se arabské kmeny dostaly k Čadskému jezeru už ve 14. století n. l. (Levy and Holl 2002) a v 16. století n. l. sídlili mezi Bahr el Gazal (region v dnešním Jižním Súdánu) a jezerem Fitri (dnešní Čad), tato oblast byla nazývána Šuwa a podle ní i tzv. Arabové Šuwa, respektive Arabové hovořící dialektem šuwa (Seignobos 2003).

Druhá cesta, jíž se arabská migrace do Afriky od 7. století n. l. ubírala, vedla z oblasti dnešního Egypta podél Středozemního moře skrz území dnešní Libye, kde se tento proud stočil na jih přes oázy Ghadames a Ghat v dnešním Fezzánu a Bilmu v dnešním Nigeru. Má se za to, že čím jižněji arabské kmeny postupovaly, tím více nahrazovaly tradiční chov velbloudů chovem hovězího dobytka (Owens 1994). V polovině 16. století pak dosáhly severního břehu Čadského jezera a sultanátu Bagirmi. Následovalo další pronikání na východ od Čadského jezera a začátkem 18. století se pak objevují za řekou Šari, jež pramení v Kamerunu a ústí do Čadského jezera (Cunnison 1966; Zeltner 1980; Zeltner 2002).

Tradiční ústně podávaný výklad původu afrických Arabů uvádí, že všechny dnešní kmeny jsou potomky dávného arabského kmene Džuhajna. Z něho pocházejí tedy jak Abbala (pastevcí velbloudů), tak Ghannama (pastevcí ovcí a koz) a i Baggara (pastevcí krav). Ty se pak dělí na mnoho dalších menších kmenů (Quasim 1996). Kmen

Džuhajna mohl pocházet z jižní Arábie a v 7. století n. l. se dostat do Egypta. Džuhajnové jež šli přes dnešní Fezzán a přešli postupně z chovu velbloudů k chovu hovězího dobytka, nejspíš dali vzniknout skupině Arabů Baggara (Quasim 1996). Tzv. proces „baggarizace“ mohl začít v 15.–16. století n. l. v Bagirmi, nebo později v 17. století n. l. na východ od Čadského jezera v sultanátu Waddaj (Owens 1994). Tento původ Arabů Baggara podporuje podle našeho kolegy Muhammada Mochtara z Univerzity v Kordofánu částečně i lingvistika. Na druhé straně předkové Arabů Šuwa jsou ti, co sledovali první trasu přes údolí Nilu (Levy a Holl, 2002) a 14. století n. l. se rovněž dostali do Čadské pánve. Arabové Šuwa však postupně přešli k částečně usedlému způsobu života.

Výše popsaná migrace z Arabského poloostrova do Afriky však nebyla poslední, příkladem jsou Arabové Rašajda, kteří dnes žijí ve východním Súdánu. Historické prameny uvádějí, že sem z Arábie přišli po roce 1860 n. l. Jejich předky jsou beduíni žijící v oblasti Hidžáz v blízkosti Mekky. V Arábii i dnes existuje mnoho kmenů označovaných Rašajda a všichni odvozují svůj původ ze saúdského Hidžázu. Podporou této skutečnosti mohou být podobnosti v tradičních ženských oděvech (Young 1996).

3.2 Cíle práce

Cíle práce byly inspirovány archeologickými a historickými doklady o jižní Arábii od období neolitu po migrace do Afriky, a dále poznatky o LP v Arábii a u afrických Arabů uvedených v předchozích studiích. Lze je v podstatě shrnout do tří bodů:

1. Odhadnout alelickou frekvenci všech pro-LP mutací v Arábii a u afrických Arabů a porovnat ji s výsledky předchozích výzkumů těchto populací, a rovněž s výsledky mtDNA. Zjistit zda výsledky budou odpovídat dosavadní představě, že nejčastější variantou v Arábii je -13915^*G , u níž se předpokládá, že se i zde poprvé objevila (Enattah et al. 2008; Imtiaz et al. 2007)
2. Porovnat subsistenci a výskyt pro-LP mutací. Zjistit, zda se mutace -13915^*G vyskytuje především u těch populací, které jsou tradičními pastevci velbloudů. Ověřit tak, zda by mohl platit předpoklad, že vznik a šíření -13915^*G souvisí s domestikací velblouda a jeho šířením do Afriky kočovnými beduíny.
3. Určit dobu, kdy varianta -13915^*G expandovala v Arábii a u afrických Arabů, porovnat výsledky s historickými doklady.

3.3 Materiál

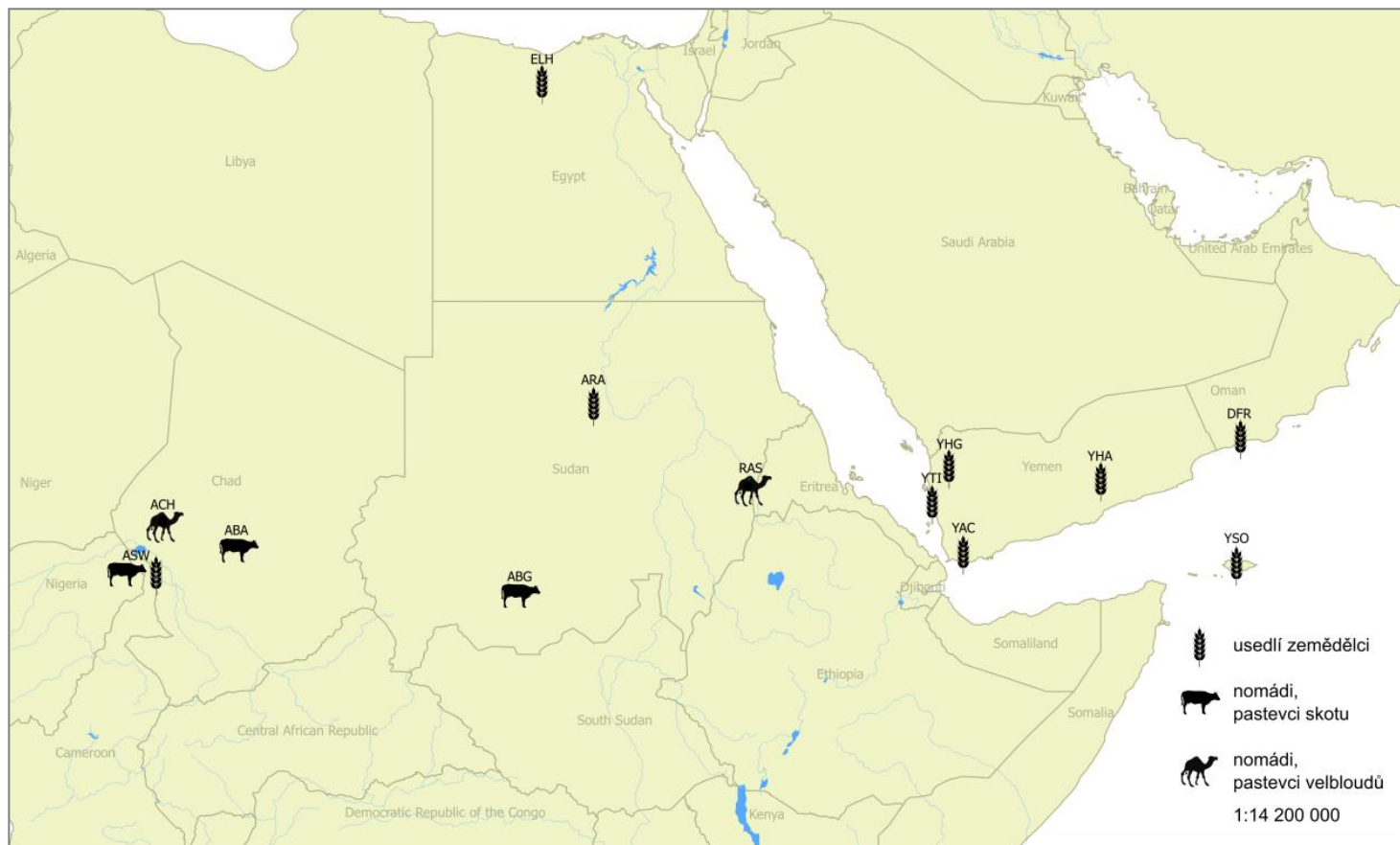
Při analýzách bylo použito celkem 620 vzorků z třinácti populačních souborů, šesti souborů z jižní Arábie – Jemenu a Ománu a sedmi souborů afrických Arabů ze Súdánu, Egypta, Čadu a Nigérie. Všechny vzorkované populace patří do semitské větve afroasijské jazykové rodiny. Zastoupeny byly jak populace usedle žijících zemědělců, tak nomádů – pastevců velbloudů a pastevců skotu. Pro detaily viz Tabulka 5 a Obrázek 14

Tabulka 5: Přehled použitých populačních souborů.

<i>soubor</i>	<i>zkratka</i>	<i>n</i>	<i>lokality</i> <i>vzorkování</i>	<i>stát</i>	<i>ZŠ</i>	<i>ZD</i>	<i>subsistence</i>	<i>rok a typ</i> <i>sběru</i>
<i>Jemenci</i>	YAC	43	al-Achkum	Jemen	44,18	13,32	usedle žijící	2005 BS
<i>Jemenci</i>	YTI	67	Hudajda - okolí	Jemen	43,00	14,82	usedle žijící	2005 BS
<i>Jemenci</i>	YHG	35	Hadžiža - okolí	Jemen	43,60	15,70	usedle žijící	2006 BS
<i>Jemenci</i>	YSO	65	Sokotra	Jemen	53,85	12,50	usedle žijící	2006 BS
<i>Jemenci</i>	YHA	40	Wadi Hadramawt	Jemen	48,74	15,93	usedle žijící	2005 BS
<i>Ománci</i>	DFR	54	Zufár	Omán	54,03	17,20	usedle žijící	krev/sliny
<i>Egyptané</i>	ELH	35	el Hayz	Egypt	28,59	29,96	usedle žijící	2004 BS
<i>Súdánští Arabové</i>	ARA	46	Karima až Kerma	Súdán	30,75	18,41	usedle žijící	2003 BS
<i>Arabové Rašajda</i>	RAS	52	Abu Talha	Súdán	36,30	15,35	nomádi, pastevci velbloudů	2011 Orogen
<i>Arabové Baggara</i>	ABG	51	Al-Ubayyid	Súdán	28,35	11,53	nomádi, pastevci skotu	2015 Norgene
<i>Arabové Baggara</i>	ABA	53	západ od Ati	Čad	17,95	13,18	nomádi, pastevci skotu	2014 Orogen
<i>Arabové Abbala</i>	ACH	27	Mao - okolí	Čad	15,31	14,12	nomádi, pastevci velbloudů	2003 BS
<i>Arabové Šuwa</i>	ASW	52	Ngala a okolí	Nigérie	14,19	12,34	částeční nomádi	2001 BS

ZŠ zeměpisná šířka, ZD zeměpisná délka, BS bukální stěr.

Vzorky byly odebrány doc. Viktorem Černým od dobrovolníků, jejichž rodiče pochází z vybrané lokality. Všichni dobrovolníci byli informováni o účelu studie a dali souhlas k anonymnímu zpracování jejich DNA, výzkum schválila etická komise Univerzity Karlovy. Vzorky již izolované DNA z ománského Zufáru nám pak poskytli kolegové Abdulrahim Al-Abri a Riad Bayoumi z Univerzity sultána Quaboose v Maskatu



Obrázek 14: Místa sběru vzorků a subsistence tamních populací.
Pro vysvětlení zkratk populačních souborů viz Tabulka 5.

3.4 Metody

3.4.1 Izolace DNA

Vzorky získané v letech 2001–2006 byly odebrány ve formě bukálního stěru, který byl uložen v 1 ml lyzačního roztoku, DNA byla izolována QIAquick PCR Purification Kitem od firmy Qiagen, pro protokol viz příloha P1. Bukální stěry i vyizolovaná DNA jsou uchovávány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Výtěžnost DNA po tomto typu izolace je sice nižší (cca 600–1800 ng z jedné izolace), avšak jedná se o kvalitní a velmi čistou DNA. Nicméně protože jsou tyto vzorky 10–14 let staré, díky degradaci a opakovaným izolacím byly výtěžky často o poznání nižší a někdy bylo nutno pracovat s pouhými 5–10 ng DNA.

Vzorky získané v letech 2014–2015 byly odebrány kitem Oragene DNA firmy DNA Genotek. Vzorek slin se odebírá do sběrné zkumavky, kde je zakonzervován speciálním roztokem, jež umožňuje skladování při pokojové teplotě, nicméně uchování v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ je vhodné při dlouhodobém skladování. Výhodou je snadná manipulace a velká výtěžnost DNA (cca 600 ng – 60 μg z jedné izolace), nicméně pořizovací cena kitu je poměrně vysoká.

Populace Arabů Baggara ze Súdánu (ABG) byla vzorkována kitem Saliva DNA Collection and Preservation Devices od firmy Norgene. Princip sběru, uchování slin a izolace DNA je obdobný jako u Oragene, cenově je kit sice levnější, nicméně v závěrečné fázi izolace se obtížně rozpouštěla DNA peleta, proto jsme od dalšího využití kitu upustili.

3.4.2 Určení pro-LP variant

Pro určení LP genotypu byl amplifikován 359 bp dlouhý úsek intronu 13 *MCM6* genu který pokrývá pět pro-LP variant. Použili jsme primery ze studie Coelho et al. 2005.

forward 5'-3' GCAGGGCTCAAAGAACAATC,
reverse 5'-3' TGTTGCATGTTTTTAATCTTTGG

Pro PCR amplifikaci byl použit GoTaq® Green Master Mix od firmy Promega. Koncentrace jednotlivých primerů v reakci byla 0,2 μM . Pro 25 μl reakci jsme použili 5–200 ng DNA (pro GoTaq® Green Master Mix je doporučeno < 250 ng pro 25 μl reakci). Amplifikace byla provedena v Eppendorf Mastercycleru podle programu:

pre-inkubace: 94 °C – 5 min
amplifikace – 35 krát: 94 °C – 1 min
54,5 °C – 1 min
72 °C – 1 min
závěrečná extenze: 72 °C – 20 min

Pro ověření výsledků amplifikace byla použita gelová elektroforéza, 1 µl produktu PCR byl nanesen do 0,8% agarózového gelu, pro vizualizaci DNA bylo použito barvivo GelRed od firmy Biotium a pro ověření délky produktů MassRuler Low Range DNA Ladder od firmy Thermo Fisher Scientific, který obsahuje jedenáct fragmentů o délce 1 031–80 bp.

Sekvence byla provedena firmou Macrogen. Vzorke byly sekvenovány *forward* primerem, při nejasnostech či výskytu více mutací byly sekvenovány i *reverse* primerem.

Chromatogramy a sekvence byly zpracovány v programech Chromas (Technelysium 1996), BioEdit (Hall 1999) a Mega (Tamura et al. 2013).

3.4.3 Získání genotypů pro odhad věku expanze mutace –13915*G

Pro určení doby, kdy expandovala mutace –13915*G bylo vybráno 307 vzorků z osmi populačních souborů, čtyř z jižní Arábie a čtyř souborů afrických Arabů. Z jednotlivých souborů, jež byly použity k analýze pro-LP mutací, byly vyřazeny vzorky s nízkou koncentrací DNA či znečištěné. Ty by byly pro citlivější analýzy problematické. U všech vzorků byl znám status pro pozici T/G–13915, viz Tabulka 6. Populační soubory byly pro následnou práci s daty sloučeny do souborů podle geografických a historických souvislostí, viz Tabulka 7.

Tabulka 6: Přehled použitých vzorků určení doby expanze mutace –13915*G.

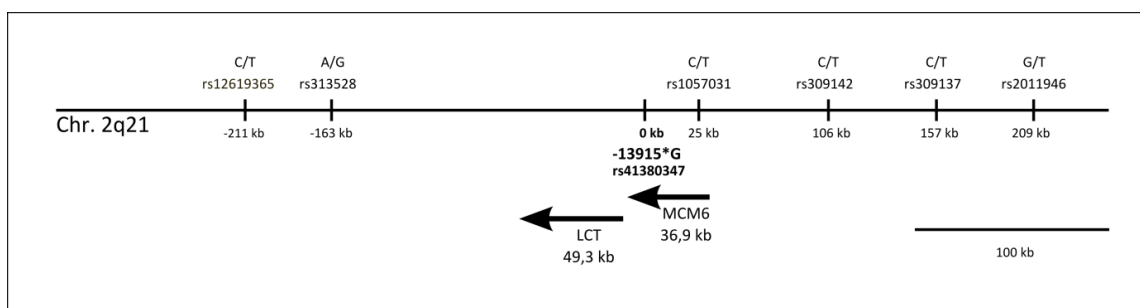
zkratka	T/G-13915			
	n	TT	TG	GG
YAC	42	6	17	19
YTI	20	4	5	11
YHG	18	2	12	4
DFR	47	7	15	25
RAS	51	4	16	31
ABA	50	29	16	5
ACH	26	8	13	5
ABG	53	33	19	1

Ve třetím až pátém sloupci je uveden status T/G-13915 a počet případů. Pro vysvětlení zkratk populacních souborů viz Tabulka 5.

Tabulka 7: Sloučené populační soubory pro určení doby expanze -13915*G

soubor	zkratky	n
afričtí Arabové Baggara a Abbala	ACH, ABG, ABA	129
Arabové Rašajda	RAS	51
Arabové Rašajda, Jemenci	RAS, YAC, YTI, YHA	131
Jemenci	YAC, YTI, YHA	80
zufárští Ománci	DFR	47

Pro 214 vzorků s mutací –13915*G (Tabulka 5 – čtvrtý sloupec heterozygoti TG a pátý sloupec homozygoti GG) bylo dále analyzováno 6 SNP, jež se nachází v okolním úseku dlouhém 419 kb. Jedná se o šest z devíti SNP, jež byly použity ve studii Heyer et al. 2011. Pro znázornění pozic jednotlivých SNP viz Obrázek 15 a Tabulka 8.



Obrázek 15: Znázornění polohy šesti SNP, jež byly použity pro odhad doby expanze mutace –13915*G.

Tabulka 8: Charakteristiky SNP, jež byly použity pro odhad doby expanze mutace –13915*G.

<i>rs</i>	<i>rs12619365</i>	<i>rs313528</i>	<i>rs41380347</i> C/G-13915	<i>rs1057031</i>	<i>rs309142</i>	<i>rs309137</i>	<i>rs2011946</i>
<i>pozice podle GRCh37/hg19 (bp)</i>	136398174	136445869	136608651	136633962	136715324	136765951	136817616
<i>pozice podle GRCh38/hg38 (bp)</i>	135640604	135688299	135851081	135876392	135957754	136008381	136060046
<i>vzdálenost od C/G-13915 (kb)</i>	-211	-163	0	25	106	157	209
<i>pozice (cM)</i>	155,509075	155,510811				155,562105	155,638882

V prvních dvou řádcích jsou uvedeny fyzické pozice na chromozomu podle starší verze referenčního genomu GRCh37/hg19 a podle novější verze GRCh38/hg38. V posledním řádku je pak genetická pozice podle databáze HapMap z roku 2011 (Consortium 2003) v cM (centi Morganech), pro rs41380347, rs1057031, rs309142, nebyly údaje o genetické pozici dostupné.

3.4.4 Vysokorozlišovací analýza křivek tání

Vysokorozlišovací analýza křivek tání označovaná zkratkou HRM (*high resolution melting*) je post-PCR metodou, kdy se na základě teplot tání ampliconů (produktů PCR) dá odhalit jejich variabilita. Obvykle se používá ke genotypizaci SNP či určení metylace. Nejprve je nutno provést kvantifikaci zkoumaného úseku metodou PCR v reálném čase (*real time PCR*), kdy se při amplifikaci do DNA řetězce vmezeřuje (interkaluje) barvivo emitující světlo pouze, je-li ve dvou-řetězcové DNA. Pomocí speciálního přístroje je pak možné sledovat díky fluorescenci probíhající PCR reakce. Při HRM se takto amplifikovaná DNA zahřívá, teplota se postupně zvyšuje a při rozpadu (tání) dvou-řetězcových ampliconů přestává barvivo emitovat světlo a přístroj pak může zaznamenat přesnou teplotu, kdy k tomuto rozpadu došlo. Při SNP genotypizaci se využívá toho, že amplicony, lišící se jen v jedné bázi, mají různou teplotu tání. Jedná se o metodu rychlou, spolehlivou a v porovnání s ostatními způsoby genotypizace (např. TaqMan sondy) poměrně levnou, nicméně poměrně citlivou na kvalitu DNA a přípravu reakcí.

Pro naše potřeby bylo nejprve nutné navrhnout a optimalizovat primery pro co nejkratší úseky ohraničující jednotlivé SNP. Čím jsou totiž amplicony kratší, tím je metoda robustnější, a navíc je nižší riziko, že se bude v daném úseku vyskytovat další

SNP. Pro navrhování primerů byl použit program Primer3 (Untergasser et al. 2012) a Primer Blast (Ye et al. 2012). Návrhy primerů pro rs12619365, rs309142, rs2011946 byly dále upraveny Sophií Lafosseovou a Robertem Debuchym z Musée de l'Homme v Paříži. Primery, velikosti ampliconů a experimentálně zjištěné teploty nasedání primerů – viz Tabulka 9.

Tabulka 9: Sekvence primerů, teplota nasedání primerů a velikosti amplifikovaných úseků v okolí šesti SNP použitých pro odhad doby expanze mutace –13915*G.

SNP		sekvence primerů 5'-3'	T_a (°C)	délka produktu (bp)	SNP a pozice (bp)
rs1269365	forward	ATTCTTAGGGTAAATTGATACAG	55	79	C/T 38
	reverse	GCCTTCTGAAGGACAGCTTCTA			
rs313528	forward	TGTGTGTTCAAGCATGAGTTGGT	60	111	A/G 48
	reverse	AGAGTGGCCTCACATACACATC			
rs1057031	forward	CAAAGCTGCAGCGTCTGGAA	60	90	C/T 50
	reverse	CCGCGAGGTCCATATTTGCT			
rs309142	forward	ACTACTCAACAAGGCACAGAC	53	104	C/T 63
	reverse	GAACTTATTTAAGTGATTAATGGG			
rs309137	forward	TTCTGCTGTTGCCACCAACC	60	118	C/T 23
	reverse	TGCCCAATGCTGGATCTGAC			
rs2011946	forward	TGGCAGAACTGCATTATAGCAA	58	75	G/T 39
	reverse	CAGTAATCTCTAATGCTCACTGC			

T_a – annealing temperature, teplota nasedání primerů

Při HRM je nutné mít při každém běhu kontroly, se kterými se analyzované vzorky porovnávají, ideálně několik vzorků s oběma variantami polymorfismu a vzorky heterozygotů. Kontroly je doporučeno získat osekvenováním daného úseku. Pro naše účely bylo nutné navrhnout nové primery pro amplifikaci a sekvenování pro SNP rs1269365 a rs2011946, protože produkty primerů použitých pro HRM byly pro sekvenování příliš krátké. Úseky obklopující ostatní SNP byly amplifikovány a sekvenovány primery použitými pro HRM, pro přehled viz Tabulka 10.

Tabulka 10: Primery použité k sekvenování kontrol pro HRM.

SNP	primer	sekvence primerů 5'-3'	T_a (°C)	délka produktu (bp)	pozice SNP (bp)	primer použitý pro sekvenaci
rs1269365	<i>forward</i>	AGACACACTGCCAAATTAACA	56	338	C/T 160	<i>forward</i>
	<i>reverse</i>	AAAGGTGGCCGAGACAAAGA				<i>reverse</i>
rs313528		viz Tabulka 9				<i>reverse</i>
rs1057031		viz Tabulka 9				<i>forward</i>
rs309142		viz Tabulka 9				<i>forward</i>
rs309137		viz Tabulka 9				<i>reverse</i>
rs2011946	<i>forward</i>	CAAGGCTGGTTCATTCTGT	55	141	G/T 71	<i>forward</i>
	<i>reverse</i>	GCCAAGCTCCCTGTGATAT				

T_a – *annealing temperature*, teplota nasedání primerů.

Směs určená pro PCR amplifikaci kontrol i přístroj byly stejné jako při určení pro-LP variant, program pro amplifikaci byl:

pre-inkubace: 94 °C – 5 min
amplifikace – 35 krát: 95 °C – 30 s
T_a (Tabulka 10) – 1 min
72 °C – 1 min
závěrečná extenze: 72 °C – 10 minut

K ověření amplifikace byla rovněž použita gelová elektroforéza za stejných podmínek jako při určení pro-LP variant a sekvenace byla provedena firmou MacroGen, pro primer primárně použitý k sekvenaci viz Tabulka 10, při nejasnostech byly úseky sekvenovány i opačným primerem.

Samotná HRM byla prováděna na čtyřech různých přístrojích: Biorad CFX96 od firmy Biorad, Rotor-Gene Q od Qiagen, LightCycler480 (LC480) od Roche a LightCycler96 (LC96) od Roche, přičemž na každém přístroji bylo nutné provést optimalizaci. Většina výsledků však pochází z LC96, proto se následující protokol týká pouze analýz na tomto přístroji.

Protože je HRM vyhodnocuje míru vyzářené fluorescence, je metoda velmi citlivá na množství DNA. Je tedy optimální, aby ve všech reakcích byla stejná koncentrace, v našem případě bylo tedy třeba vzorky naředit tak, aby jejich koncentrace této podmínce odpovídala. Metoda je rovněž citlivá na znečišťující látky, které ovlivňují průběh PCR, např. etanol, problematické vzorky tak bylo nutné z analýzy vyřadit. Je rovněž optimální, aby DNA všech vzorků analyzovaných zároveň pocházela ze stejné izolace a rovněž i DNA kontrol. Obvykle tedy bylo analyzováno jedno SNP pro jeden populační soubor. V jednom běhu mohlo být analyzováno zároveň pouze rs313528 a rs309137, protože T_a obou je stejná (60°C).

Pro reakci byla použita originální směs od firmy Roche pro HRM analýzy – High Resolution Melting Master při koncentraci $MgCl_2$ 2 mM. Koncentrace každého primeru v reakční směsi byla 0,25 μM , doporučená koncentrace DNA je 5–30 ng na 20 μl reakci, pro tuto studii bylo použito 20 ng na 10 μl reakci.

Reakční profil byl následující:

pre-inkubace:	95 °C – 10 min
amplifikace – 45 krát:	95 °C – 10 s
	T_a (Tabulka 9) – 15 s
	72 °C – 15 s
HRM:	95 °C – 1 min
	40 °C – 1 min
	60–95 °C se zvýšením o 2,2 °C/s

Vyhodnocení experimentů bylo provedeno softwarem příslušejícím k přístroji. Grafy byly vizuálně zkontrolovány a pro vzorky, jež se odchylovaly od kontrol, byl experiment opakován, případně byly amplifikovány a sekvenovány za stejných podmínek jako kontroly.

3.5 Vyhodnocení dat

3.5.1 Intra-populační vyhodnocení výskytu pro-LP mutací

Frekvence mutací zjištěných v analyzovaném úseku byly spočítány programem GeneAlEx (verze 6.501 a 6.503) (Peakall and Smouse 2012). Pro pro-LP varianty byly stejným softwarem zjišťovány χ^2 testem odchylky od Hardy-Weinbergovy (H-W) rovnováhy, heterozygotita, fixační index (FI). Tyto výpočty byly provedeny pro třináct populačních souborů (viz Tabulka 5, str. 54) a pro mutace -13910*T, -13915*G a -14009*G a rovněž pro pět souborů určených pro odhad doby expanze mutace -13915*G (viz Tabulka 7, str. 58)

3.5.2 Inter-populační srovnání

Pro populační soubory (Tabulka 5, str. 54) a pro SNP C/G-13907, C/T-13910, T/G-13915, T/G-14009, G/C-14010 byla provedena analýza molekulárního rozptylu (AMOVA, *analysis of molecular variance*), a pro genotypová data spočítána Φ_{PT} statistika (PT, *population*), již byly testovány genetické rozdíly mezi populacemi (Φ_{PT} je analogie F_{ST} – F statistiky). Počet permutací byl nastaven na 999 a počet permutací pro párová srovnání byl rovněž 999. Na základě matice Φ_{PT} vzdáleností byla provedena analýza hlavních koordinát (PCoA, *principal coordinates analysis*). Všechny uvedené inter-populační analýzy byly rovněž provedeny programem GeneAlEx (Peakall and Smouse 2012).

3.5.3 Odhad doby expanze mutace -13195*G

214 vzorků (homozygotů a heterozygotů pro -13915*G), u nichž bylo analyzováno šest SNP v 419 kb dlouhém úseku v okolí T/G-13915 (viz Obrázek 15, str. 58) bylo spolu s touto variantou zřazováno. Vzorky byly pro fázování a další analýzy rozděleny do pěti souborů vzniklých sloučením souborů – viz Tabulka 7, str. 58. K fázování byl použit program PHASE 2.1 (Stephens and Scheet 2005; Stephens et al. 2001) a pro každý z pěti souborů bylo provedeno pět běhů s použitím různých náhodných čísel pro vstupní hodnotu -S (rozmezí 111–7755). Frekvence, se kterou je možné, aby se daný haplotyp u jedince vyskytl -F byla nastavena na 0,5; počet iterací byl nastaven na 9999. Pro

soubor afrických Arabů (ACH, ABG, ABA) vyšlo ve třetím běhu o jeden haplotyp méně, byl tedy proveden šestý běh, který byl shodný se čtyřmi předchozími.

Odhad doby expanze mutace -13915^*G v populaci byl proveden metodou publikovanou v práci Austerlitz et al. 2003. Metoda odhaduje zároveň rychlost růstu (*growth rate*) a dobu, kdy se mutace rozšířila v populaci. Kód se spouští v programu Mathematica 5.2 (Wolfram Research 2005). Vstupními daty je počet chromozomů s nefrekventovanějším haplotypem s -13915^*G a celkový počet haplotypů s -13915^*G , míra rekombinace (*recombination rate*) mezi prvním a posledním markerem (viz poslední řádek Tabulka 8, str. 59), současná frekvence alely -13915^*G v populaci a současná celková velikost populace (nominální, tedy nikoli efektivní velikost) – ta byla zprůměrována z dat uvedených v roce 2015 veřejně dostupnými zdroji jako je Ethnologue (Lewis and Simons 2015) a Joshua projekt (www.joshuaproject.net). Samotný odhad byl proveden za pomoci autora metody – Frédérica Austerlitz z Musée de l'Homme v Paříži. Pro návod (*Readme*) viz přílohu P2.

3.6 Výsledky

3.6.1 Intra-populační variabilita

Tabulka 11: Frekvence nalezených mutací ve zkoumaném 359 bp dlouhém úseku intronu 13 genu *MCM6*

<i>lokality, populace</i>	<i>zkr.</i>	<i>n</i>	<i>-13907*G</i>	<i>-13910*T</i>	<i>-13915*G</i>	<i>-14009*G</i>	<i>-14010*C</i>	<i>-13913*C</i>	<i>-13965*G</i>	<i>-14042*G</i>	<i>-14107*A</i>	<i>-14156*A</i>
<i>Jemen, al-Achkum, Jemenci</i>	YAC	43			(37) 0,651	(1) 0,012	(1) 0,012					
<i>Jemen, Hudajda, Jemenci</i>	YTI	67	(1) 0,0075		(53) 0,590		(1) 0,0075					
<i>Jemen, Hadždža, Jemenci</i>	YHG	35			(30) 0,614							
<i>Jemen Sokotra, Jemenci*</i>	YSO	65		(5) 0,046	(50) 0,569							
<i>Jemen Hadramawt, Jemenci*</i>	YHA	40		(3) 0,038	(19) 0,250							
<i>Omán Zufár, Ománci*</i>	DFR	54			(45) 0,657							
<i>Egypt, el Hayz, Egyptané</i>	ELH	35			(1) 0,014	(4) 0,057				(1) 0,014		
<i>Súdán, Karima až Kerma, Arabové</i>	ARA	46	(1) 0,011		(8) 0,087	(11) 0,130						
<i>Súdán, Abu Talha, Arabové Rašajda</i>	RAS	52			(48) 0,760							
<i>Súdán, Al-Ubayyid, Arabové Baggara</i>	ABG	53		(2) 0,019	(20) 0,198	(2) 0,019						(1) 0,0094
<i>Čad, západ od Ati, Arabové Baggara</i>	ABA	51		(4) 0,039	(21) 0,255	(3) 0,029		(1) 0,0098				
<i>Čad, Mao – okolí, Arabové Abbala</i>	ACH	27	(1) 0,019	(1) 0,019	(19) 0,444	(2) 0,037						
<i>Nigérie, Ngala a okolí, Arabové Šuwa</i>	ASW	52		(9) 0,087	(6) 0,067	(1) 0,010			(1) 0,010		(2) 0,019	

V závorce je počet jedinců s danou mutací (homozygotů i heterozygotů), pro-LP mutace jsou označeny tučně, zkr. – zkratka

U třinácti zkoumaných populací jižní Arábie a afrických Arabů bylo objeveno všech pět dnes známých pro-LP variant plus vzácně několik dalších. Všechny případy C/G-13907, G/C-14010 a vzácně se vyskytlé varianty byly v heterozygotním stavu. Nejfrekventovanější alela -13915*G se vyskytuje ve všech souborech. Další dvě nejčastěji se vyskytující varianty jsou -14009*G (zjištěna u sedmi souborů) a -13910*T (zjištěna u šesti souborů); viz Tabulka 11

U Ománců ze Zufáru (DFR), Arabů Rašajda ze Súdánu (RAS) a Jemenců z Hadždži (YHG) byla určena pouze -13915*G, u zbylých souborů se vyskytuje několik pro-LP variant. Nejvíce, čtyři pro-LP mutace -13907*G, -13910*T, -13915*G a -14009*G byly nalezeny u Arabů Baggara z Čadu (ACH). Někteří jedinci jsou rovněž nositeli dvou pro-LP mutací zároveň, kombinace heterozygotů -13915*G a -13910*T se vyskytla celkem šestkrát (tři jedinci ABA, jeden ACH, jeden ASW a jeden YHA), kombinace heterozygotů -13915*G a -14009*G byla určena rovněž šestkrát (jeden ABA, jeden ABG, dva ACH, dva ARA), dále byl určen jeden heterozygot pro varianty -13915*G a -14010*C (YAC) a jeden heterozygot -13910*T a -14009*G (ABA).

3.6.2 Výskyt mutace -13915*G

U souborů ze západního Jemenu (YAC, YTI, YHG), Sokotry (YSO) a ománského Zufáru (DFR) jsou frekvence -13915*G srovnatelné 56,9–65,7 %, nejméně v rámci jižní Arábie je tato varianta zastoupena u Jemenců z Hadramawtu (25 %). U afrických Arabů se frekvence pohybují od 1,4 % u Egyptanů z el Hayz až po 76 % u Arabů Rašajda; viz Tabulka 11 a Tabulka 12.

V rámci testování intra-populační variability byl pro nejfrekventovanější varianty proveden χ^2 test H-W rovnováhy, viz Tabulka 12, 13 a 14. Pro polymorfismus T/G-13915 nebylo vychýlení u žádného z testovaných souborů signifikantní při $\alpha = 0,05$.

Dalším nástrojem testování intra-populační variability v populaci je fixační index (FI) nebo také koeficient *inbreedingu*, jež je dán vztahem: $FI = \frac{H_e - H_o}{H_e}$, kde H_e je očekávaná heterozygozita (podíl heterozygotů) při náhodném párování $H_e = 1 - \sum p_i^2$ (p_i je frekvence i -té alely) a H_o je pozorovaná heterozygozita. Hodnoty FI se pohybují v rozmezí -1 až 1, přičemž hodnoty blízké nule předpokládají náhodné

párování, kladné hodnoty ukazují na *inbreeding* a záporné hodnoty na nadbytek heterozygotů. Vyšší pozitivní hodnoty FI ($> 0,15$) pro mutaci -13915^*G byly nalezeny u pěti souborů: FI = 0,167 u Jemenců z al-Hudajdy (YTI), FI = 0,184 u Jemenců ze Sokotry (YSO), FI = 0,219 u Ománců ze Zufáru (DFR), FI = 0,174 u Arabů Baggara ze Súdánu (ABA) a FI = 0,234 u Arabů Šuwa z Nigérie (ASW). Tyto výsledky tedy ukazují na relativně vyšší podíl homozygotů. Pro Jemence z Hadramawtu (YHA) je naopak FI = $-0,2$, zde je tedy vychýlení směrem k vyššímu počtu heterozygotů, avšak jak bylo zmíněno výše, k porušení H-W rovnováhy nedošlo u žádného ze souborů, neboť p-hodnoty χ^2 nejsou signifikantní. Důvodem zvýšeného počtu homozygotů může být mírný *inbreeding*, zvýšení počtu heterozygotů pak může být naopak způsobeno negativním asortativním párováním (jedinci si vybírají partnery, jež se od nich geneticky liší) nebo díky selekci ve prospěch heterozygotů (Peakall and Smouse 2012).

3.6.3 Výskyt mutace -13910^*T

Nejvyšší zastoupení alely -13910^*T bylo zjištěno u Arabů Šuwa z Nigérie (ASW) 8,7 %, nejnižší u Arabů Baggara ze Súdánu (ABG) a Abbala z Čadu (ACH) – 1,9 % u obou souborů. U sedmi souborů pak -13910^*T nebyla identifikována vůbec, jednalo se o čtyři populace z jižní Arábie (YAC, YTI, YHG, DFR) a tři z Afriky (ELH, ARA a RAS).

U souboru ze Sokotry (YSO) bylo prokázáno vychýlení z H-W rovnováhy na $\alpha = 0,05$ (p-hodnota = 0,015), u všech ostatních souborů s výskytem -13910^*T vychýlení z H-W rovnováhy vyšlo jako nesignifikantní. Pokud je však počet případů v jednotlivých kategoriích (CC, CT a TT) menší než pět, což je u C/T-13910 ve většině případů u genotypů CT a TT, je třeba výsledky interpretovat s opatrností (Peakall and Smouse 2012).

Co se týče FI, ten opět je kladně vychýlen u Jemenců ze Sokotry (YSO) FI = 0,301.

Tabulka 12: Intra-populační variabilita pro -13915*G

<i>populace</i>	<i>n</i>	<i>-13915*G</i>	<i>TT</i>	<i>TG</i>	<i>GG</i>	χ^2	<i>p-hodnota</i>	H_o	H_e	<i>FI</i>
YAC	43	0,651	6	18	19	0,265	0,606	0,419	0,454	0,079
YTI	67	0,590	14	27	26	1,876	0,171	0,403	0,484	0,167
YHG	35	0,614	5	17	13	0,022	0,883	0,486	0,474	-0,025
YSO	65	0,569	15	26	24	2,209	0,137	0,400	0,490	0,184
YHA	40	0,250	21	18	1	1,600	0,206	0,450	0,375	-0,200
DFR	54	0,657	9	19	26	2,587	0,108	0,352	0,450	0,219
ELH	35	0,014	34	1		0,007	0,932	0,029	0,028	-0,014
ARA	46	0,087	38	8		0,417	0,518	0,174	0,159	-0,095
RAS	52	0,760	4	17	31	0,571	0,450	0,327	0,365	0,105
ABG	53	0,198	33	19	1	0,872	0,350	0,358	0,318	-0,128
ABA	51	0,255	30	16	5	1,546	0,214	0,314	0,380	0,174
ACH	27	0,444	8	14	5	0,068	0,795	0,519	0,494	-0,050
ASW	52	0,067	46	5	1	2,851	0,091	0,096	0,126	0,234

-13915*G – frekvence alely -13915*G, χ^2 – chí kvadrát test Hardy-Weinbergovy rovnováhy, p-hodnota – p-hodnota χ^2 testu, H_o pozorovaná heterozygotita, H_e – předpokládaná heterozygotita, FI – fixační index, pro vysvětlení zkratk populací viz Tabulka 11.

Tabulka 13: Intra-populační variabilita pro -13910*T

<i>populace</i>	<i>n</i>	<i>-13910*T</i>	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	χ^2	<i>p-hodnota</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>FI</i>
YAC	43									
YTI	67									
YHG	35									
YSO	65	0,046	60	4	1	5,892	0,015*	0,062	0,088	0,301
YHA	40	0,038	37	3		0,061	0,805	0,075	0,072	-0,039
DFR	54									
ELH	35									
ARA	46									
RAS	52									
ABG	53	0,019	51	2		0,020	0,889	0,038	0,037	-0,019
ABA	51	0,039	47	4		0,085	0,771	0,078	0,075	-0,041
ACH	27	0,019	26	1		0,010	0,922	0,037	0,036	-0,019
ASW	52	0,087	43	9		0,467	0,495	0,173	0,158	-0,095

-13910*T – frekvence alely -13910*T χ^2 – chí kvadrát test Hardy-Weinbergovy rovnováhy, p-hodnota – p-hodnota χ^2 testu (* signifikantní při 0,05), *H_o* pozorovaná heterozygotita, *H_e* – předpokládaná heterozygotita, FI – fixační index, pro vysvětlení zkratk populací viz Tabulka 11.

Tabulka 14: Intra-populační variabilita pro -14009*G

<i>populace</i>	<i>n</i>	<i>-14009*G</i>	<i>TT</i>	<i>TG</i>	<i>GG</i>	χ^2	<i>p-hodnota</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>FI</i>
YAC	43	0,012	42	1		0,006	0,939	0,023	0,023	-0,012
YTI	67									
YHG	35									
YSO	65									
YHA	40									
DFR	54									
ELH	35	0,057	31	4		0,129	0,720	0,114	0,108	-0,061
ARA	46	0,130	35	10	1	0,080	0,777	0,217	0,227	0,042
RAS	52									
ABG	53	0,019	51	2		0,020	0,889	0,038	0,037	-0,019
ABA	51	0,029	48	3		0,047	0,829	0,059	0,057	-0,030
ACH	27	0,037	25	2		0,040	0,842	0,074	0,071	-0,038
ASW	52	0,010	51	1		0,005	0,944	0,019	0,019	-0,010

-14009*G – frekvence alely -14009*G, χ^2 – chí kvadrát test Hardy-Weinbergovy rovnováhy, p-hodnota – p-hodnota χ^2 testu, *H_o* pozorovaná heterozygotita, *H_e* – předpokládaná heterozygotita, FI – fixační index, pro vysvětlení zkratk populací viz Tabulka 11.

3.6.4 Výskyt mutace -14009*G

Mutace -14009*G byla nejvíce zastoupena u súdánských Arabů (ARA) – 13 %, nejméně pak u Jemenců al-Achkum (YAC) – 1,2 %. Určena nebyla vůbec u šesti souborů, pěti z jižní Arábie (YTI, YHG, YSO, YHA, DFR) a jednoho z Afriky (RAS).

U všech sedmi souborů s výskytem -14009*G nebylo prokázáno vychýlení z H-W rovnováhy na hladině $\alpha = 0,05$. Hodnoty FI se pohybovaly od -0,061 do 0,042. Avšak výskyt genotypů TG a GG byly ve většině případů menší než pět. Viz Tabulka 14.

3.6.5 AMOVA

Tabulka 15 shrnuje výsledky analýzy molekulárního rozptylu (AMOVA).

Tabulka 15: Analýza molekulárního rozptylu pro jednotlivé varianty a jejich kombinace

<i>zkoumané pozice</i>	<i>VV</i> <i>(%)</i>	<i>MV</i> <i>(%)</i>	Φ_{PT}
C/G-13907, C/T-13910, T/G-13915, T/G-14009, G/C-14010	64	36	0,359
C/T-13910, T/G-13915, T/G-14009	64	36	0,361
C/T-13910	95	5	0,053
T/G-13915	60	40	0,397
T/G-14009	89	11	0,106

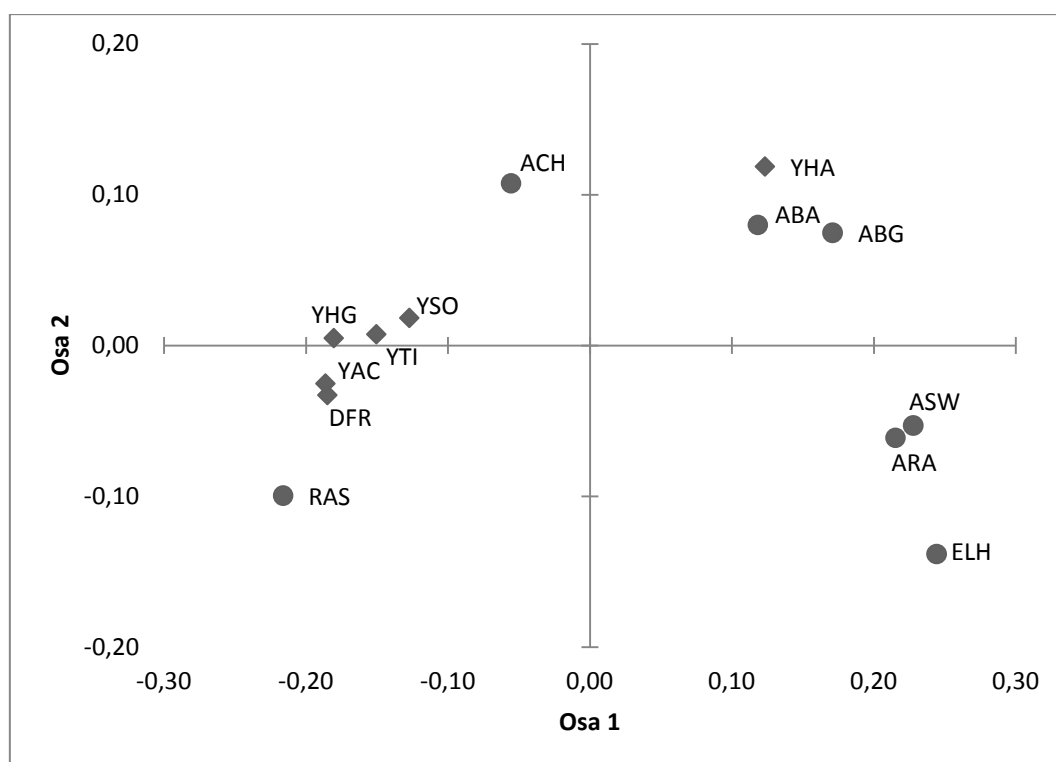
VV – vnitro-populační variabilita, MV – mezi-populační variabilita, Φ_{PT} statistika

Výsledky vnitro- a mezi-populační variability zjištěné AMOVA pro všechny pro-LP varianty se neliší od výsledků pro kombinaci pozic C/T-13910, T/G-13915 a T/G-14009. V obou případech 64 % odpovídá variabilitě uvnitř populací a 36 % variabilitě mezi populacemi. Podíváme-li se na T/G-13915 zvlášť, je vnitro-populační variabilita 60 % a mezi-populační 40 %. Hlavní příčinou variability mezi populacemi je tedy T/G-13915. Φ_{PT} statistika říká, že pokud je $\Phi_{PT} = 0$, platí H_0 – mezi populacemi nejsou genetické rozdíly, $\Phi_{PT} > 0$ platí H_1 – mezi populacemi jsou genetické rozdíly. V našem případě je Φ_{PT} u všech populací nenulové, nejvyšší 0,397 je pak pro T/G-13915, tedy tento polymorfismus je příčinou největší mezi-populační variability zde hodnocených souborů.

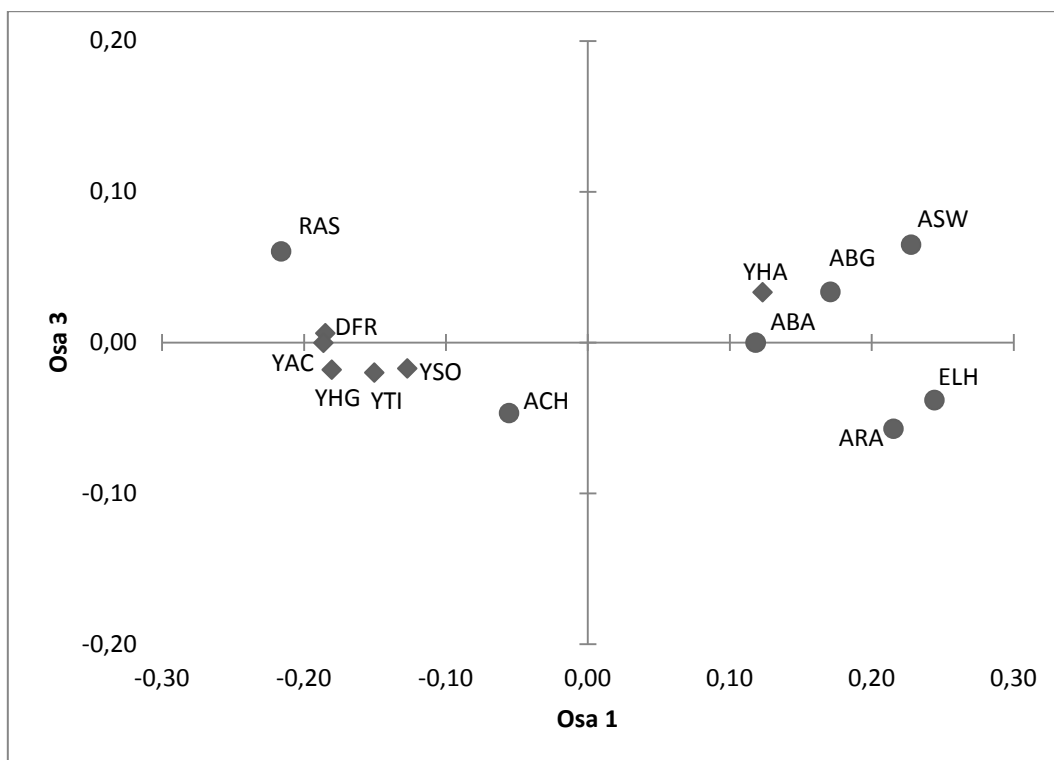
3.6.6 PCoA

Analýza hlavních koordinát je metodou, jež umožňuje znázornit genetické vzdálenosti mezi populacemi pro data, jež mají více proměnných (v našem případě několik mutací). Každá osa (koordináta) v analýze PCoA vysvětluje proporcionálně méně variability než ta předchozí. Výsledky jsou interpretovány nejčastěji na základě prvních dvou až tří os, které vysvětlí většinu variability v rámci testovaných dat (Peakall and Smouse 2012).

Na základě Φ_{PT} vzdáleností vypočítaných pomocí AMOVA byla provedena PCoA pro všech pět polymorfismů souvisejících s LP, pro grafické znázornění viz Obrázek 16 (osa 1 a 2) a Obrázek 17 (osa 1 a 3).

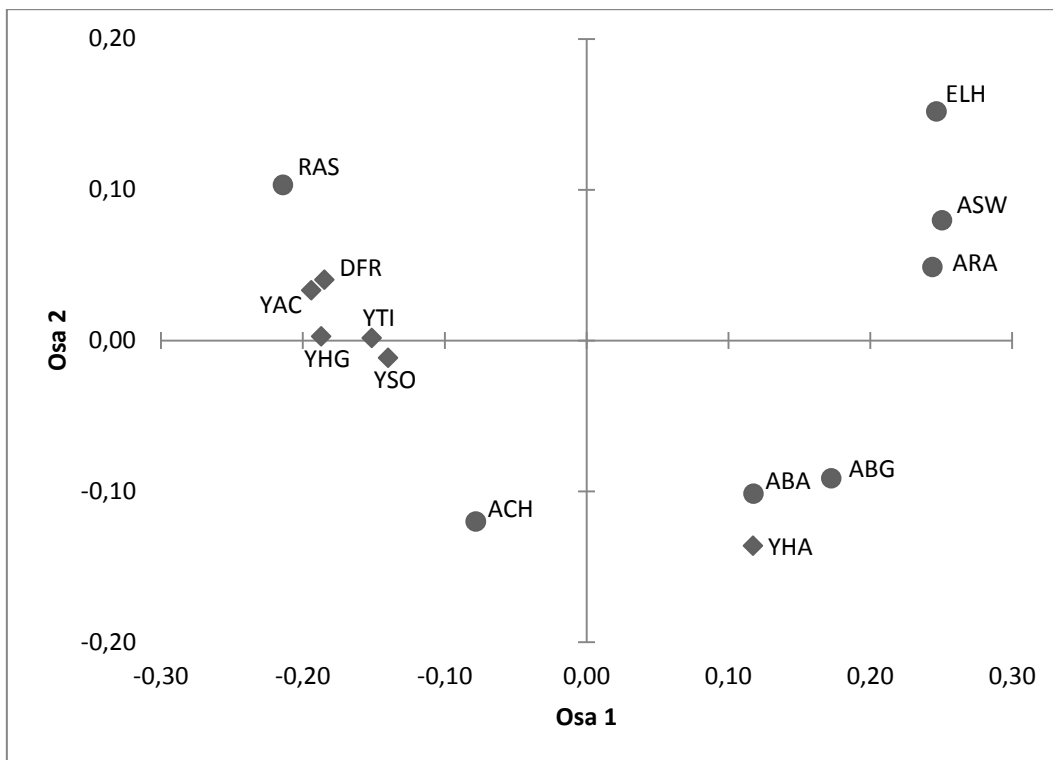


Obrázek 16: PCoA pro C/G–13907, C/T –13910, T/G –13915, T/G –14009, G/C –14010. Osa 1 a 2, kolečka – soubory afrických Arabů, čtverečky – soubory jižní Arábie, pro vysvětlení zkratk viz Tabulka 11.



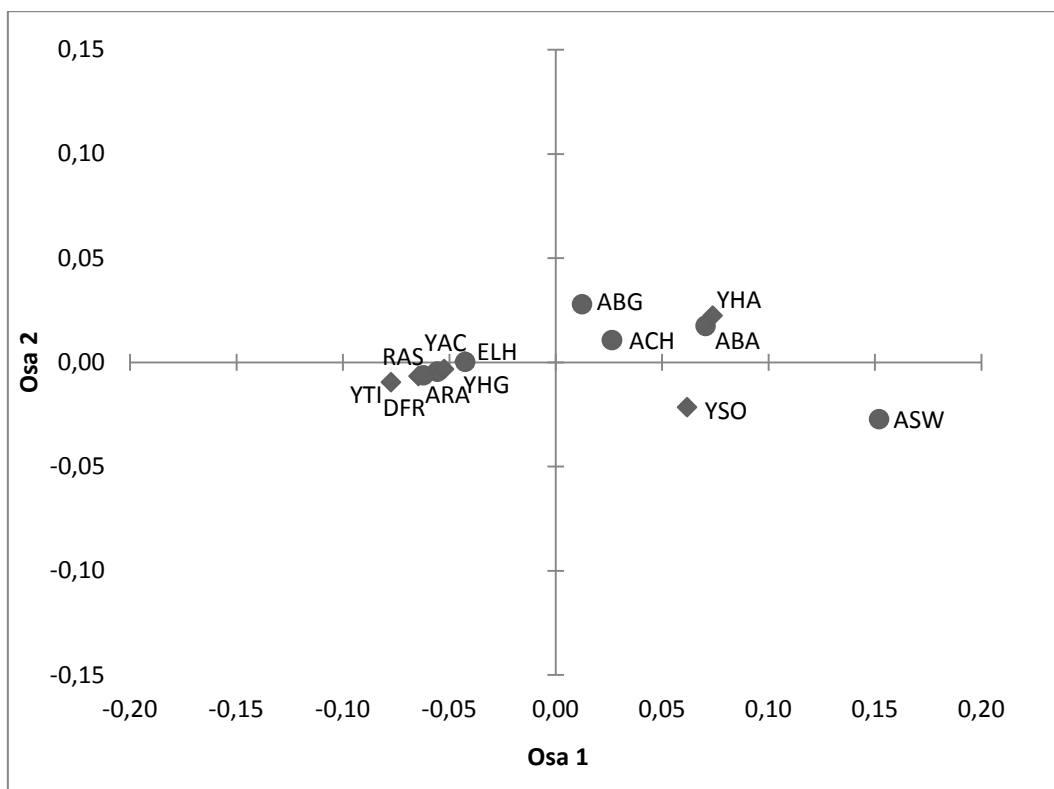
Obrázek 17: PCoA pro C/G–13907, C/T–13910, T/G–13915, T/G–14009, G/C–14010. Osa 1 a 3, kolečka – soubory afrických Arabů, čtverečky – soubory jižní Arábie, pro vysvětlení zkratk viz Tabulka 11.

Na obou grafech je patrné rozdělení populací do dvou skupin, podle frekvence –13915*G, v levé části grafu jsou soubory s frekvencí výskytu –13915*G přibližně > 40 % a v pravé části je to < 40 %. Pro srovnání byl vytvořen graf PCoA pro C/G–13915 samostatně (osa 1 a 2), viz Obrázek 18. Zde lze v levé části pozorovat shluk populací s frekvencí –13915*G vyšší než 57 %. Jedná se o soubory z jižní Arábie mimo Jemenců z Hadramawtu (YHA) a Araby Rašajda (RAS).

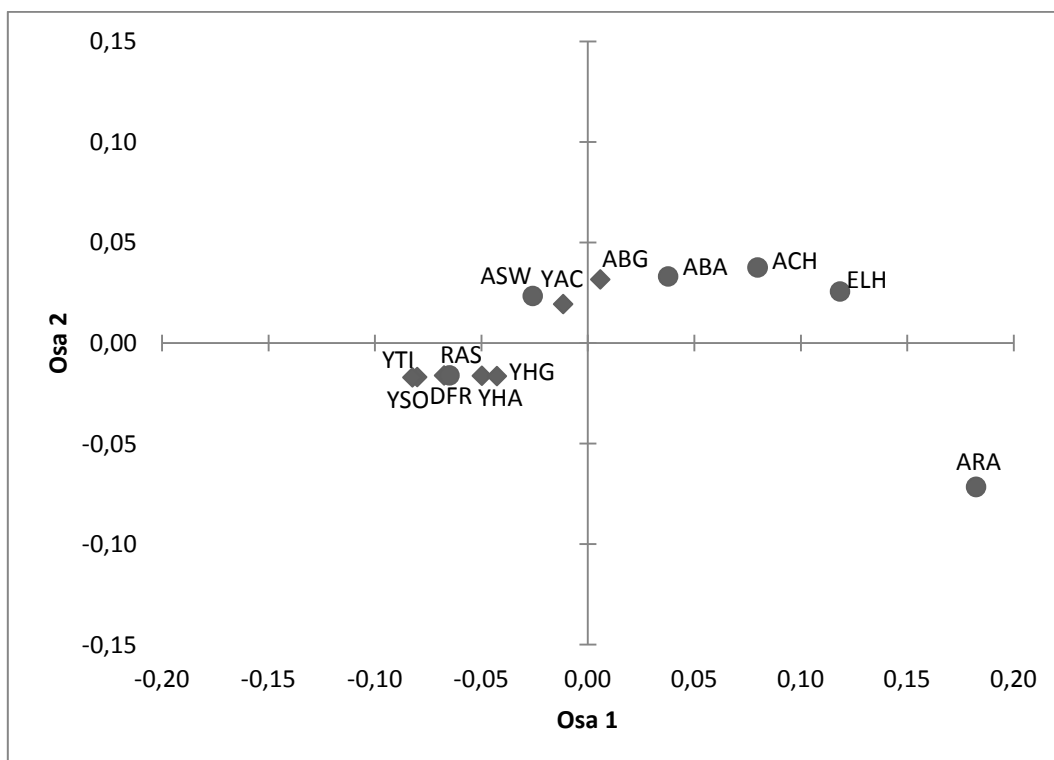


Obrázek 18: PCoA pro T/G -13915. Osa 1 a 2, kolečka – soubory afrických Arabů, čtverečky – soubory jižní Arábie, pro vysvětlení zkratk viz Tabulka 11.

Pro srovnání jsou zobrazeny ještě grafy PCoA pro C/T-13910 (Obrázek 19) – osa 1 a osa 2 a T/G-14009 (Obrázek 20) – osa 1 a 2. V levé části obou grafů je shluk souborů, u nichž nebyla zkoumaná pro-LP mutace určena, v pravé části obrázků je pak soubor se znatelně vyšším výskytem pro-LP mutace oproti ostatním, v případě -13910*T jsou to Arabové Šuwa z Čadu (ASW) a v případě -14009*G pak súdánští Arabové (ARA). Pro upřesnění viz Tabulka 16, kde je uvedeno, jaké procento variability vysvětlují první tři osy PCoA. Graf pro C/T-13910, T/G-13915 a T/G-14009 dohromady není uveden, neboť se výrazně neodlišuje od grafu pro všech pět variant (Obrázek 16).



Obrázek 19: PCoA pro C/T-13910. Osa 1 a 2, kolečka – soubory afrických Arabů, čtverečky – soubory jižní Arábie. Pro vysvětlení zkratek viz Tabulka 11.



Obrázek 20: PCoA pro T/G-14009. Osa 1 a 2, kolečka – soubory afrických Arabů, čtverečky – soubory jižní Arábie, pro vysvětlení zkratek viz Tabulka 11.

Tabulka 16: Variabilita vysvětlená prvními 3 osami PCoA.

<i>zkoumané pozice</i>	<i>variabilita vysvětlená prvními 3 osami (%)</i>		
	Osa 1	Osa 2	Osa 3
C/G–13907, C/T–13910, T/G–13915, T/G–14009, G/C–14010	78,83	14,63	3,51
C/T–13910, T/G–13915, T/G–14009	78,83	14,59	3,51
C/T–13910	94,32	4,77	0,91
T/G–13915	78,25	17,20	3,57
T/G–14009	85,88	12,39	1,36

3.6.7 Odhad doby expanze mutace –13915*G

Pro soubory, jež byly použity pro datování expanze –13915*G, byly rovněž provedeny testy intra-populační variability, viz Tabulka 17. Vychýlení z H-W rovnováhy nevyšlo signifikantní u žádného z testovaných souborů při $\alpha = 0,05$, včetně sloučených souborů. Vyšší pozitivní hodnoty dosáhl FI opět u souboru Ománců ze Zufáru (0,252). Porovnáme-li frekvenci –13915*G mezi jednotlivými soubory, nejnižší 27,1 % je u afrických Arabů Baggara a Abbala (ACH, ABG, ABA), nejvyšší pak u Arabů Rašajda (RAS) 76,5 %.

Tabulka 17: Intra-populační variabilita pro -13915*G u souborů pro odhad expanze -13915*G

<i>soubor</i>	<i>zkratky</i>	<i>n</i>	<i>-13915*G</i>	<i>T</i>	<i>TG</i>	<i>G</i>	χ^2	<i>p-hodnota</i>	H_o	H_e	<i>FI</i>
<i>afričtí Arabové Baggara a Abbala</i>	ACH, ABG, ABA	129	0,271	70	48	11	0,449	0,503	0,372	0,395	0,059
<i>Arabové Rašajda</i>	RAS	51	0,765	4	16	31	0,838	0,360	0,314	0,360	0,128
<i>Arabové Rašajda, Jemenci</i>	RAS, YAC, YTI, YHA	131	0,687	16	50	65	1,657	0,198	0,382	0,430	0,112
<i>Jemenci</i>	YAC, YTI, YHA	80	0,638	12	34	34	0,518	0,472	0,425	0,462	0,080
<i>Zufárští Ománci</i>	DFR	47	0,691	7	15	25	2,984	0,084	0,319	0,427	0,252

-13915*G – frekvence alely -13915*G, χ^2 – chí kvadrát test Hardy-Weinbergovy rovnováhy, p-hodnota – p-hodnota χ^2 testu, H_o pozorovaná heterozygotita, H_e – předpokládaná heterozygotita, FI – fixační index

Pro 214 vzorků, u nichž se vyskytla mutace –13915*G (heterozygotů a homozygotů – viz Tabulka 17 – šestý a sedmý sloupec), bylo určeno celkem 22 haplotypů sestávajících ze 7 SNP (T/G-13915 plus 6 okolních SNP). Pro přehled haplotypů viz Tabulka 18.

Tabulka 18: Haplotypy sedmi polymorfismů a jejich zastoupení v jednotlivých souborech.

<i>haplotyp č.</i>	<i>pozice</i>							<i>soubor/počet haplotypů</i>				
	rs12619365 C/T	rs313528 A/G	rs41380347 T/G-13915	rs1057031 C/T	rs309142 C/T	rs309137 C/T	rs2011946 G/T	ACH, ABG, ABA	RAS	YAC, YTI, YHG	YAC, YTI, YHG, RAS	DFR
1	T	A	G	C	T	C	G	66	77	96	173	64
2	T	A	T	T	C	C	G	13	8	14	22	3
3	T	A	T	C	T	C	G	10	1	8	9	2
4	T	A	T	C	C	C	G	6	2	3	5	1
5	C	G	T	C	T	T	T	5		3	3	2
6	T	A	G	C	T	C	T	3	1	5	6	1
7	T	A	T	C	C	T	G	2				
8	T	A	T	T	C	T	G	2				
9	T	A	T	C	T	T	G	2		1	1	3
10	T	A	T	C	C	C	T	2				
11	T	A	G	T	C	C	G	1				
12	C	G	T	C	T	T	G	1	1	2	3	
13	T	A	T	T	C	T	T	1				
14	T	G	T	T	C	C	G	1				
15	C	G	T	C	T	C	G	1		1	1	1
16	C	G	T	C	T	C	T	1				1
17	T	A	T	T	T	C	G	1				
18	T	A	T	C	T	T	T		3		3	2
19	C	A	T	C	T	T	T		1		1	
20	T	A	T	T	T	T	G			1	1	
21	C	G	G	C	T	C	G			1	1	
22	T	A	T	C	C	T	T			1	1	

U všech populací byl nejčastější haplotyp č. 1 (TAGCTCG). Největší počet variant haplotypů (17) byl určen u Arabů Baggara a Abbala (ACH, ABG, ABA), nejnižší počet (7) pak u souboru Arabů Rašajda (RAS).

Pro odhad doby expanze mutace v populaci byla použita metoda spojující odhad věku alely a rychlosti růsu podle Austerlitz et al. 2003. Používají se jen haplotypy s odvozenou mutací, v tomto případě tedy s -13915^*G . Pro datování se používá četnost majoritního haplotypu a počet všech haplotypů s mutací -13915^*G (viz Tabulka 19) a dále současná frekvence alely v populaci a velikost současné populace (Austerlitz et al. 2003), viz Tabulka 20. Dále je nutno znát míru rekombinace (*recombination rate*) mezi prvním a posledním markerem, v našem případě (mezi rs12619365 a rs2011946) je to 0,129807 cM.

Tabulka 19: Četnost majoritního haplotypu s -13915^*G a všech haplotypů s -13915^*G

haplotyp č.	haplotyp	soubor/četnost haplotypů				
		ACH, ABG, ABA	RAS	YAC, YTI, YHG	YAC, YTI, YHG, RAS	DFR
1	TAGCTCG	66	77	96	173	64
6	TAGCTCT	3	1	5	6	1
11	TAGTCCG	1				
21	CGGCTCG			1	1	
	Celkem haplotypů	70	78	102	180	65

Kromě věku alely je výsledkem metody Austerlitz et al. 2003 i rychlost růstu – výsledek je tedy interpretován jako odhad věku expanze mutace v populaci. Rychlost růstu, jež byla určována alelu -13915^*G , ukazuje zvýšení počtu jejích kopií od doby, kde se poprvé objevila v populaci, reflektuje rovněž selekční tlak, který na ni působil (Austerlitz et al. 2003; Heyer et al. 2011).

Pro výsledky viz Tabulka 20. Nejstarší odhad doby expanze mutace -13915^*G 1 510 let (v intervalu 1 356–1 799 let) byl určen pro populaci Jemenců (YAC, YTI, YHG). Naopak nemladší 250 let (v intervalu 219–312 let) u Arabů Rašajda (RAS), u nichž byla ale zároveň určena i nejvyšší rychlost růstu 3,435 (v intervalu 2,922–4,714), nejnižší rychlost růstu byla zjištěna u Arabů Baggara a Abbala (ACH, ABG, ABA) 1,248 (v intervalu 1,212–1,322). Sloučení Arabů Rašajda s Jemenci dalo vyšší rychlost růstu -13915^*G než pro Jemence samotné. Pro africké Araby Baggara a Abbala byl pak určen jen o o něco mladší věk -13915^*G než u Jemenců, avšak rychlost růstu je nižší než u Jemenců. Výsledky zufárských Ománců ukazují nedávnou expanzi -13915^*G před 276 lety (v intervalu 241–345 let) a rychlost růstu 3,020 (v intervalu 2,605–4,031) jen o něco nižší než u Arabů Rašajda.

Tabulka 20: Odhad doby expanze mutace –13915*G

<i>soubor</i>	N_0	r	<i>KI r</i>	g	<i>KI g</i>	<i>ODEM (roky)</i>	<i>KI ODEM (roky)</i>
<i>afričtí Arabové Baggara a Abbala</i>	1530500	1,248	1,212-1,322	57,9	51,0-71,3	1449	1274-1782
<i>Arabové Rašajda</i>	98000	3,435	2,922-4,714	10,0	8,8-12,5	250	219-312
<i>Arabové Rašajda, Jemenci</i>	6098000	1,453	1,397-1,570	41,6	37,6-49,3	1041	939-1233
<i>Jemenci</i>	6000000	1,285	1,250-1,356	60,4	54,3-72,0	1510	1356-1799
<i>zufárští Ománci</i>	100000	3,020	2,605-4,031	11,1	9,7-13,8	276	241-345

N_0 – celková velikost populace, r – růst alely (*growth rate*), *KI* – konfidenční interval, g – generace, *ODEM* – odhad doby expanze mutace –13915*G (1 generace = 25 let)

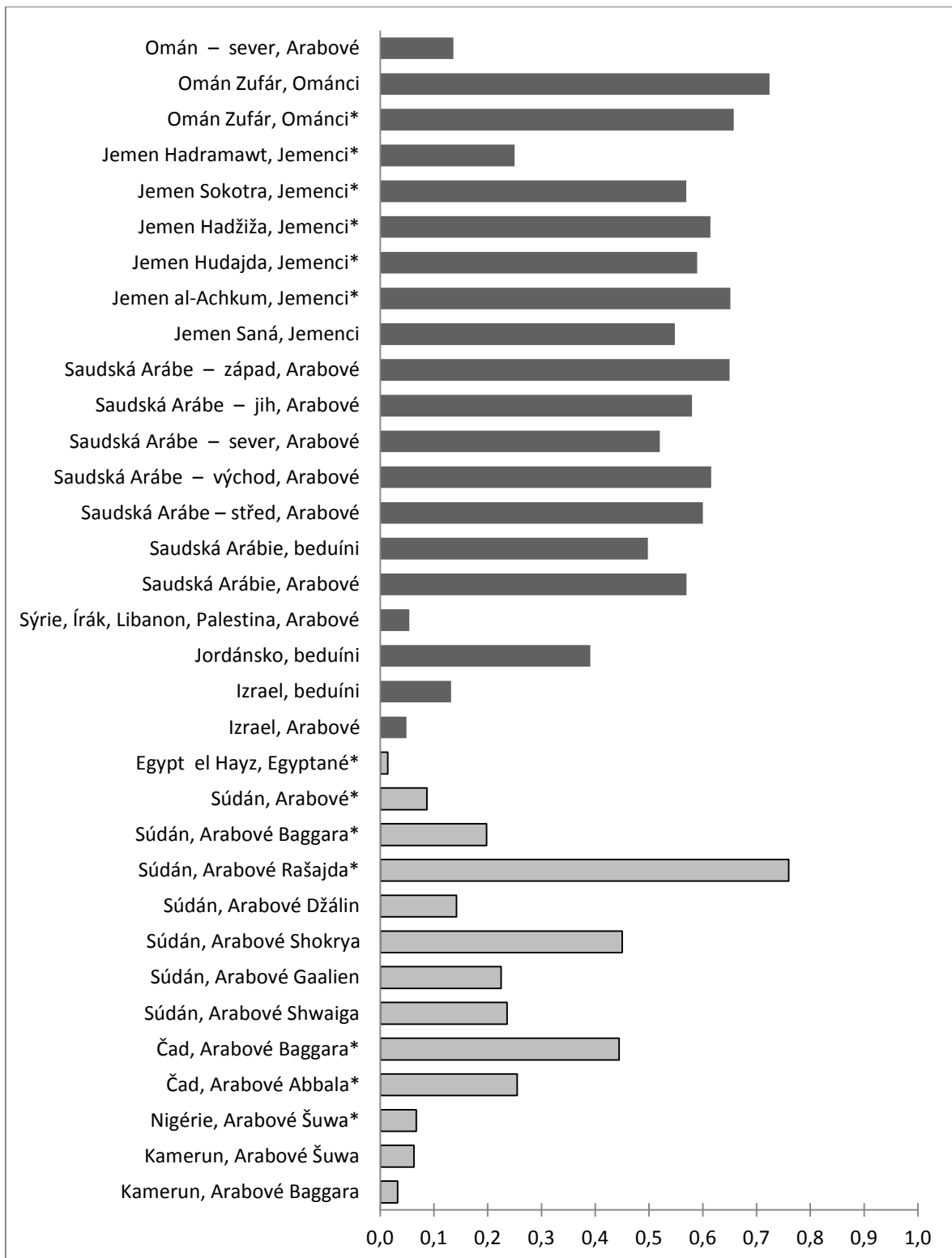
3.7 Diskuze

3.7.1 Diverzita pro-LP mutací v Arábii a u afrických Arabů

Pro-LP mutace -13915^*G se nejčastěji vyskytuje u populací Arabského poloostrova a afrických Arabů (Al-Abri et al. 2012b; Enattah et al. 2008; Hassan et al. 2016; Imtiaz et al. 2007; Ingram et al. 2007; Ingram et al. 2009b; Ranciaro et al. 2014). Ve studiích Enattah et al. 2008 a Imtiaz et al. 2007 byla vyslovena teorie, že původ této mutace je právě na Arabském poloostrově. Tuto představu podporuje už ten fakt, že v Africe nacházíme nejvyšší frekvence -13915^*G u populací s arabským původem, u ne-arabských populací se vyskytuje v mnohem menší míře. Tato fakta by tedy rovněž mohla svědčit pro arabský původ -13915^*G a proběhlý genový tok, díky němuž se rozšířila i do několika sousedních populací (Ranciaro et al. 2014).

Pro tuto dizertaci byla použita DNA od celkem 620 jedinců z třinácti populačních souborů (šesti souborů z jižní Arábie a sedmi souborů afrických Arabů) a byl analyzován 359 bp dlouhý úsek v intronu 13 genu *MCM6*, ve kterém se nachází všechny dnes známé pro-LP mutace (Coelho et al. 2009). U všech zkoumaných souborů byla identifikována alela -13915^*G ve frekvenci 1,4–76 % u souborů afrických Arabů a 25–65,7 % u souborů z jižní Arábie.

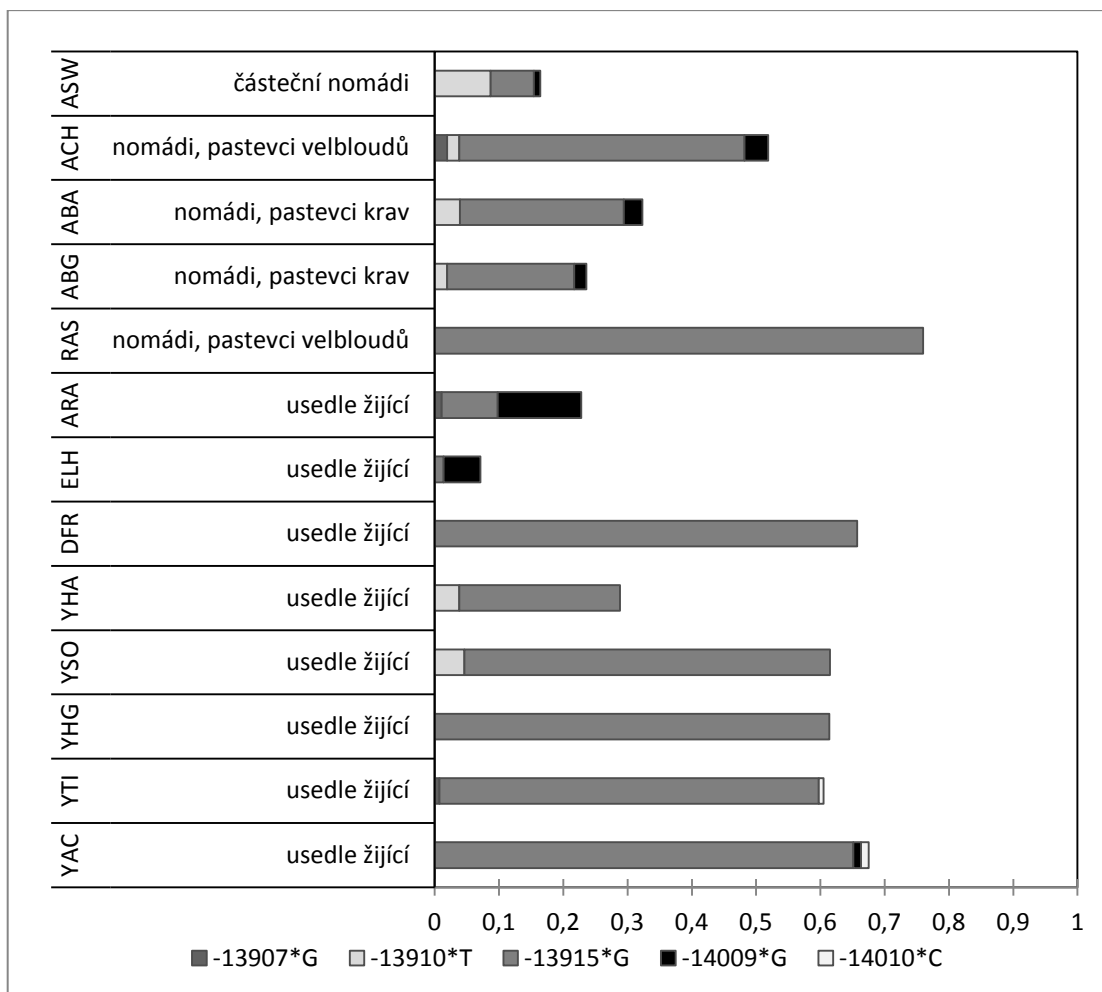
Obrázek 21 ukazuje srovnání zde zjištěných a dříve publikovaných výsledků pro populace z Arabského poloostrova a soubory afrických Arabů. Z grafu je patrné, že zde zjištěné frekvence se příliš neodlišují od dříve publikovaných dat. Výjimkou jsou Arabové Rašajda, kteří mají ze všech zobrazených (i ze všech doposud analyzovaných) populací nejvyšší zastoupení -13915^*G – ve frekvenci 76 %. Tímto se tedy více než populacím africkým podobají populacím Saúdské Arábie, Jemenu a Ománu, kde je frekvence této alely u většiny analyzovaných souborů vyšší než 50 %. Pokud vezmeme v potaz historii Rašajdů, není tento výsledek až tak překvapivý, neboť se jedná o recentní migranty, kteří přišli do Afriky až po roce 1860; jejich předkové pocházejí zřejmě z oblasti Hidžáz v dnešní Saúdské Arábii (Young 1996).



Obrázek 21: Frekvence mutace -13915*G u populací Arabského poloostrova a u afrických Arabů. Osa x – frekvence -13915*G, osa y – lokalita, název populace. Data byla vybrána z publikovaných studií, detaily v příloze P3. * označuje soubory z této studie, tmavě šedě jsou znázorněny soubory z Arabského poloostrova, světle šedě soubory z afrických Arabů.

Kolegyně Jana Nováčková se ve své disertační práci z roku 2016 zabývala mimo jiné také analýzou Y-chromozomální DNA u Arabů Rašajda. Na základě SNP polymorfismů zjistila nízkou genetickou diverzitu a rovněž pro STR polymorfismy jen velmi malý počet haplotypů (Nováčková 2016). Tyto výsledky a výsledky uvedené v této dizertaci tedy mohou poukazovat na to, že populace prošla efektem zakladatele (*founder effect*). Z Arábie do Afriky mohla přijít jen malá skupina, možná i vzájemně si příbuzných osob (blízké kmeny), která se za svou krátkou historii na africkém kontinentě nestihla diverzifikovat tak, jako ostatní arabské populace, jejichž předkové přišli do Afriky dříve.

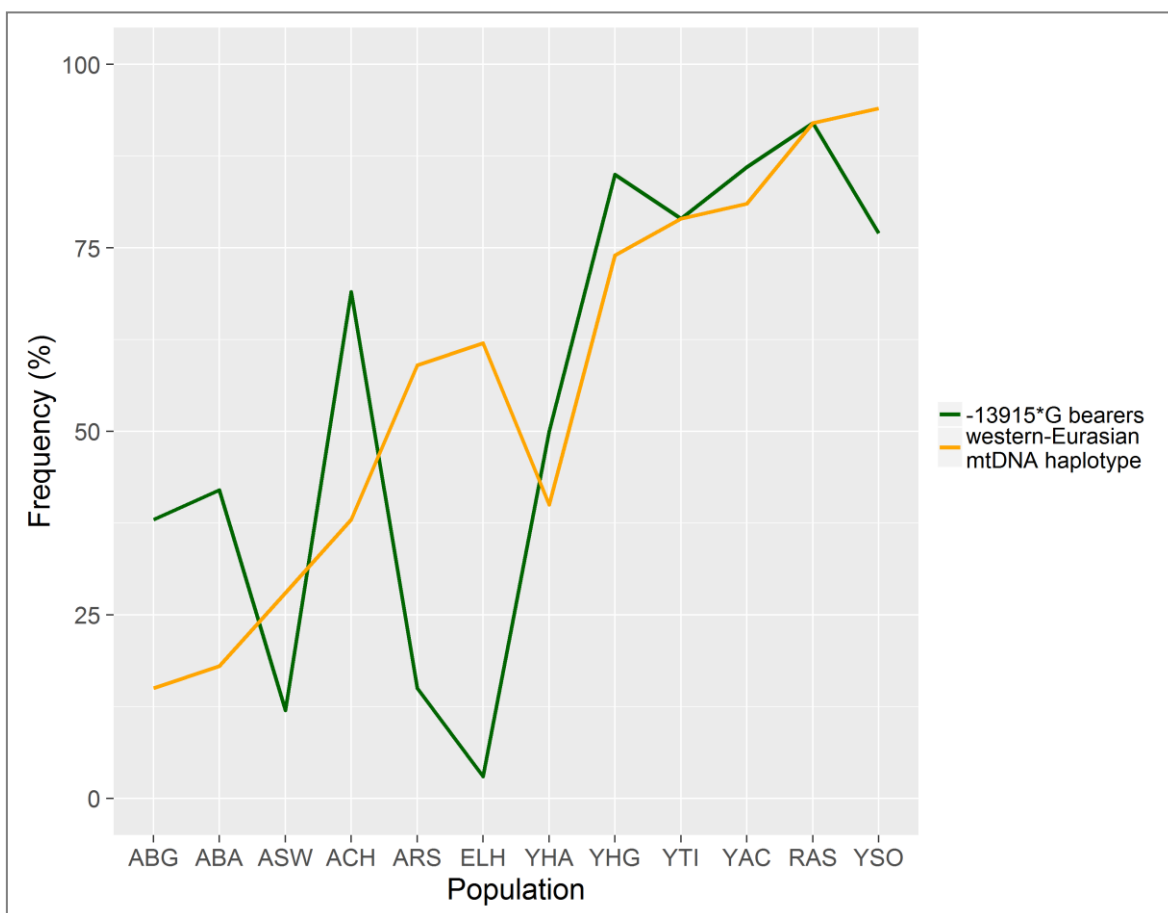
Vysoká frekvence -13915^*G u Rašajdů může být důsledkem výše uvedených skutečností, ale jistě souvisí také s tím, že Rašajdové se stále živí pastevectvím a velbloudí mléko patří mezi hlavní složky jejich jídelníčku (Černý osobní sdělení na základě dotazů během výzkumu v Súdánu). Celkově u zkoumaných souborů afrických Arabů lze pozorovat, že výskyt -13915^*G je nejvyšší u Arabů Abbala z Čadu (ACH) a Rašajda (RAS) ze Súdánu, jež řadíme mezi pastevece velbloudů, viz Obrázek 22. Tento fakt může rovněž podporovat teorii, že se -13915^*G objevila na Arabském poloostrově v souvislosti s domestikací velblouda (Enattah et al. 2008). U Arabů Baggara (ABA, ABG) a Šuwa (ASW) mohlo dojít ke snížení frekvence -13915^*G díky genovému toku ze strany původních afrických obyvatel (Černý et al. 2007), díky nimž také pravděpodobně rovněž přešli z chovu velbloudů k chovu hovězího dobytka (Owens 1994).



Obrázek 22: Výskyt pro-LP mutací a subsistence u 13 zkoumaných souborů jižní Arábie a afrických Arabů. Osa x zkratka souboru a subsistence, osa y frekvence pro-LP mutací.

ASW – Arabové Šuwa, Nigérie; ACH – Arabové Abbala, Čad; ABA – Arabové Baggara, Čad; ABG – Arabové Baggara, Súdán; RAS – Arabové Rašajda, Súdán; ARA – Arabové, Súdán; ELH – Egypťané el Hayz, Egypt; DFR – Ománci Zufár, Omán; YHA – Jemenci Hardamawt, Jemen; YSO – Jemenci Sokotra, Jemen; YHG – Jemenci Hadždža, Jemen; YTI – Jemenci Hudajda, Jemen; YAC – Jemenci al-Achkum, Jemen

Co se týče dat mtDNA, Obrázek 23 představuje graf výskytu západno-eurasijských mtDNA haploskupin a podíl osob s -13915^*G v daném souboru. Můžeme zde vidět, že nejnižší podíl západno-eurasijských mtDNA haploskupin a tedy nejvyšší podíl afrických mtDNA haploskupin je právě Baggarů (ABG, ABA) a Šuwů (ASW) (Priehodová et al. 2017).



Obrázek 23: Podíl osob s -13915^*G a západno-eurasijských haplotypů u souborů afrických Arabů a souborů z Jemenu (Priehodová et al. 2017).

ASW – Arabové Šuwa, Nigérie; ACH – Arabové Abbala, Čad; ABA – Arabové Baggara, Čad; ABG – Arabové Baggara, Súdán; RAS – Arabové Rašajda, Súdán; ARS – Arabové, Súdán; ELH – Egypťané el Hayz, Egypt; DFR – Ománci Zufár, Omán; YHA – Jemenci Hardamawt, Jemen; YSO – Jemenci Sokotra, Jemen; YHG – Jemenci Hadždža, Jemen, YTI – Jemenci Hudajda, Jemen; YAC – Jemenci al-Achkum, Jemen;

U jemenských a jedné ománské populace byla určena -13915^*G ve 25–65,7 % a v ojedinělých případech identifikovány i další mutace. Spolu s vysokou frekvencí -13915^*G se tedy dá usuzovat, že polovina až dvě třetiny těchto lidí má LP. Dnešní Jemenci jsou klasifikováni jako populace usedlých zemědělců, vysoké frekvence LP mohou tedy vypovídat o důležitosti mléčného hospodářství v minulosti, tak jak to ostatně navrhuje kulturně-historická hypotéza (Holden and Mace 2002; McCracken 1971; Simoons 1970).

Dobytěk byl nejspíše do jižní Arábie zaveden z Předního východu nebo Afriky již před 8 000 lety, k nezávislé domestikaci zde patrně nedošlo (McCorrison and Martin 2009). Zvířata se pravděpodobně využívala nejdříve k mléčné produkci a až v době, kdy zde lidé začali pěstovat rostliny i k tahu a orbě (Černý 2016). Tradičně byl skot chován v horských oblastech Zufáru, kde je dostatek pastvin, zdejší horalé (*džabali*) chovali hovězí dobytek, ale i kozy a velbloudy převážně pro produkci mléka. V sušších oblastech Arábie byl pak chován jednohrbý velbloud – dromedár. Původně byl rovněž využíván pro mléko a vlnu a teprve později jako soumar. Pro srovnání, v analyzovaném souboru ze Zufáru byla zjištěná frekvence -13915^*G téměř 66 %, tedy nejvyšší z použitých jihoarabských souborů.

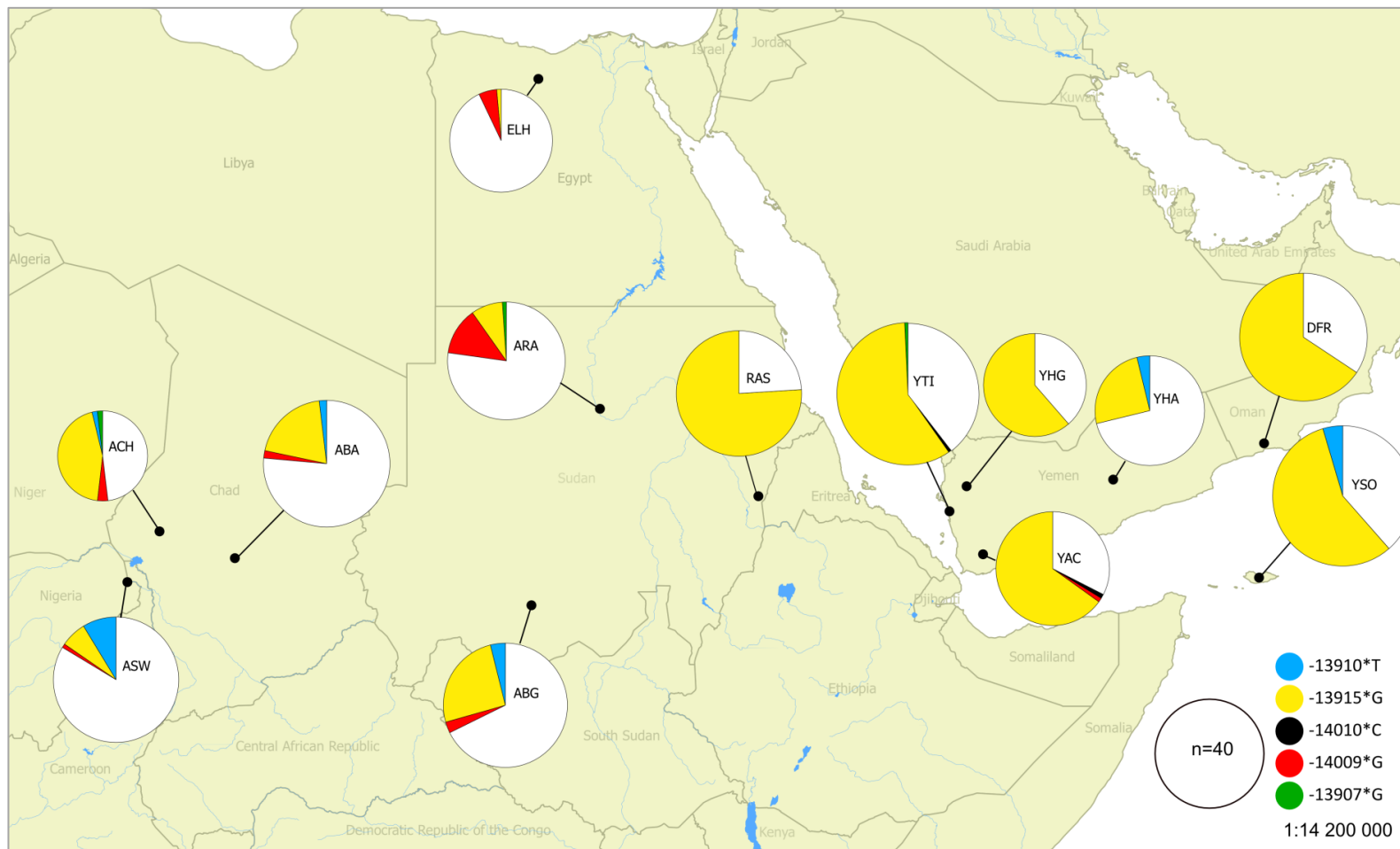
Pastevectví patří spolu s pěstováním datlovníku a rybařením k hlavním způsobům obživy i na jemenském ostrově Sokotra. I zde nalézáme vysokou frekvenci -13915^*G – 57 %. Na základě archeologických dokladů není zřejmé, kdy a kým došlo k prvnímu osídlení tohoto ostrova, ale výsledky analýz mtDNA ukazují, že ke kolonizaci ostrova mohlo dojít zhruba před 6 000 lety a před 3 000 lety zde pravděpodobně došlo k populační expanzi (Fernandes et al. 2015; Černý et al. 2009). Frekvence -13915^*G (57 %) je podobná těm, co nalézáme na Arabském poloostrově, zdá se tedy, že sem tato mutace byla přinesena kolonisty z Arábie, aniž by došlo k efektu zakladatele jako v případě Rašajdů.

U Hadramí (lidé z Hadramawtu) bylo určeno nejnižší zastoupení -13915^*G – pouze 25 % a z dalších variant pak jen 3,8 % -13910^*T . Na první pohled je to výsledek poměrně překvapivý, neboť právě ve východní části jižní Arábie má pastevectví a chov skotu dlouhou tradici – kultury spjaté s pastevectvím jsou zde doloženy již před 6 000 lety (McCorrison and Martin 2009). Na straně druhé je ale třeba poznamenat, že současné prostředí Hadramawtu není pro chov dobytka vhodné, pouštní klima je vhodnější spíše pro chov velbloudů (Černý 2016). Vysvětlení dnešní frekvence LP může být v opakovaném

vysídlování oblasti a zpětných migracích, jež tato oblast prodělala během posledních 500 let. Např. v Etiopii, Somálsku, Indii či Singapuru vznikaly tzv. hadramí diaspory, z nichž se po čase někteří jejich obyvatelé vraceli zpět do Hadramawtu i se ženami, které pocházely z těchto oblastí (Manger 2010). To by ostatně vysvětlovalo i vyšší četnost sub-saharských mtDNA haploskupin v našem souboru – viz Obrázek 23, u souboru YHA je patrný nejnižší podíl euroasijských mtDNA haploskupin ze všech souborů jižní Arábie, tedy nejvyšší podíl sub-saharských mtDNA haploskupin hned po Arabech Baggara (ABG, ABA), Abbala (ACH) a Šuwa (ASW) (Priehodová et al. 2017; Černý 2016).

Pro znázornění výskytu pro-LP mutací a geografické poloha zkoumaných souborů viz Obrázek 24. Vysoké frekvence -13915^*G u souborů jižní Arábie (kromě Jemenců z Hadramawtu – YHA) odpovídají dříve publikovaných datům, (Obrázek 21). U souboru Jemenců z al-Achkum (YAC) a al-Hudajdy (YTI) se pak vyskytují pro LP-mutace jinak typické pro východní Afriku: -13907^*G , -14010^*C a 14009^*G (Jones et al. 2013; Ranciaro et al. 2014), což může poukazovat na kontakty mezi oběma břehy Rudého moře, případně na v minulosti probíhající obchod africkými otroky (Černý 2016).

Přestože se podle mtDNA prokázala spojitost Hadramawtu s východní Afrikou (Rídl et al. 2009; Černý et al. 2008), paradoxně v tomto souboru nebyly žádné pro-LP mutace typické pro východní Afriku objeveny, pouze -13910^*T (viz Obrázek 24). -13910^*T se kromě Evropy vyskytuje i v Indii a mohla se sem tedy dostat díky hadramí diaspoře. Rovněž v poslední studii mtDNA jemenských populací byly objeveny haplotypy, jež by mohly být původem z Indie (Černý et al. 2016).



Obrázek 24: Mapa výskytu pro-LP mutací u třinácti populací analyzovaných v této studii.

DFR – Ománci Zufár, YSO – Jemenci Sokotra, YHA – Jemenci Hadramawt, YAC – Jemenci al-Achcum, YHG – Jemenci Hadždža, YTI – Jemenci Hudajda, RAS – Arabové Rašajda, ELH – Egypťané el Hayz, ARA – Arabové Súdán, ABG – Arabové Baggara Súdán, ABA – Arabové Baggara Čad, ACH – Arabové Abbala, ASW – Arabové Šuwa.

Diverzita pro-LP mutací u souborů afrických Arabů je vyšší než u souborů z jižní Arábie. Důvodem je pravděpodobně genový tok mezi africkými Araby a původními africkými populacemi. Celkově nejvyšší frekvence –13910*T mezi zkoumanými soubory byla určena u nigerijských Arabů Šuwa (ASW) – 8,7 %, v nižším zastoupení pak i u Arabů Baggara (ABG, ABA) a Abbala (ACH). –13910*T je nejvíce zastoupena v Evropě, byla však objevena i u Fulbů z Mali a Kamerunu (Lokki et al. 2011; Mulcare et al. 2004; Ranciaro et al. 2014). Naše dosud nepublikované výsledky třinácti fulbských souborů (n=592) ze západního sahelu ukazují na výskyt této mutace v rozsahu 17,6–59,6 % (Obrázek 10, str. 29). Příčinou výskytu –13910*T u Arabů Šuwa, Baggara a Abbala může být právě genový tok ze strany Fulbů. Kamerunští Fulbové sdílí totiž stejné haplotypové pozadí –13910*T s kamerunskými Araby Baggara (Ranciaro et al. 2014).

Mutace –13907*G byla na základě výsledků předchozích studií objevena převážně u populací východní Afriky, jako jsou súdánské Bedžové, keňští Masajové, nebo etiopští Oromové či Afarové (Jones et al. 2015; Ranciaro et al. 2014; Tishkoff et al. 2007). V našich souborech ji nacházíme jen ojediněle, u súdánských Arabů (ARA) a Arabů Baggara z Čadu (ABA). Překvapivě nebyla nalezena u Arabů Šuwa (ASW), ačkoli se předpokládá, že při počáteční migraci směřovali z Egypta jižně podél Nilu – tedy přes oblast, kde je dnes nejvyšší výskyt –13907*G.

Zajímavá je mutace –14009*G. Ačkoli byla zjištěna již ve studii Ingram et al. 2009b to, že je rovněž příčinou LP bylo zjištěno až později ve studii Jones et al. 2013. Ve studii Jones et al. 2015 však její zjištěné frekvence nebyly nijak vysoké, nejvyšší výskyt byl detekován u súdánských populací Beni Amer 11,7 % a Džálin (*Jaali*) 7 %. V našich souborech byla tato mutace identifikována ve všech zkoumaných afrických souborech kromě Arabů Rašajda (RAS). Nejvyšší zastoupení (rovněž i nejvyšší mezi publikovanými daty) má u súdánských Arabů (ARA) – 13 %, nejnižší pak u Arabů Šuwa (ASW) 1 %. Z výsledků je rovněž patrné, že s výjimkou Arabů Abbala (ACH), se směrem z východu Afriky na západ její frekvence snižuje. K publikování máme připraveny výsledky ze súdánské populace Bedža, kde byla –14009*G určena ve frekvenci 42 %, je tedy možné, že nejdříve se tato mutace rozšířila u kúšitských populací východní Afriky, avšak pro ověření bude třeba dalších výzkumů.

3.7.2 Odhad doby expanze mutace –13915*G

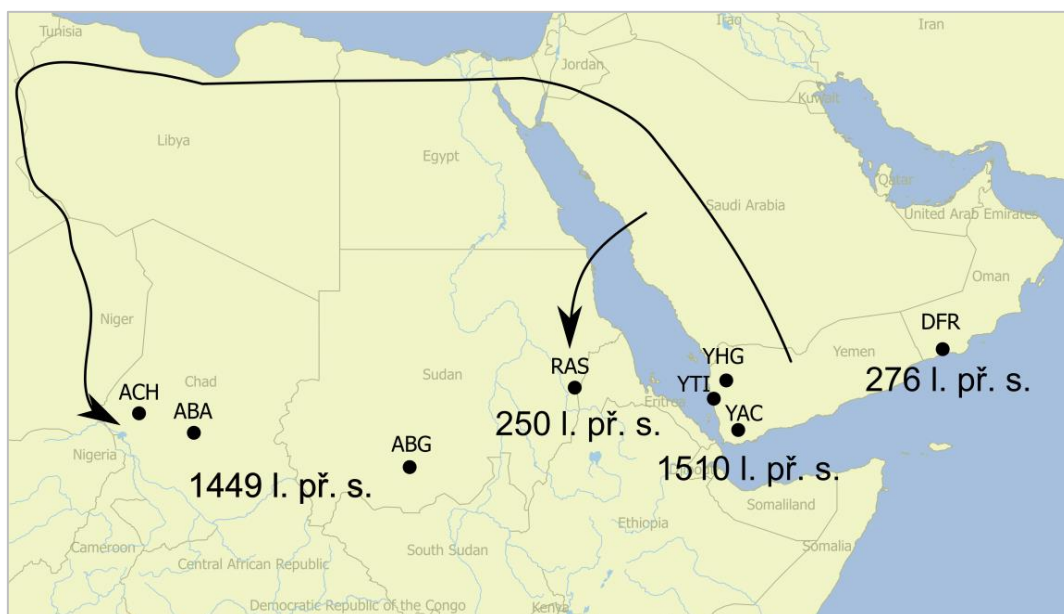
Pomocí metody poskytující spojený odhad stáří a expanze alely (Austerlitz et al. 2003) byla určena doba, kdy začala expandovat –13915*G. Do analýzy bylo zahrnuto 307 vzorků v rámci pěti populačních souborů – západní Jemenci (Hadždža, al-Hudajda a al-Achkum) zuffárští Ománci, Arabové Bagarra a Abbala a Arabové Rašajda. Rovněž byla testována varianta, kdy byl sloučen soubor Arabů Rašajda se souborem západních Jemenců. Analýza byla provedena na základě šesti SNP v okolí –13915*G, které byly určovány jen u jedinců nesoucích –13915*G (n=214).

Nejstarší odhad (1 356–1 799 let před současností) vyšel pro soubor z Jemenu a jen o něco mladší (1 274–1 782 let před současností) pro Araby Baggara a Abbala. Tato data by mohla teoreticky odpovídat období, kdy došlo k rozpadu karavanních království v jižní Arábii (7. století n. l.) a následným migracím arabských beduínů do Afriky, které byly rovněž spojeny s šířením islámu. Předpokládá se, že při těchto migracích postupovali arabští pastevci velbloudů přes Sinaj, kde se proud rozdělil dvěma směry – předkové dnešních Arabů Šuwa pokračovali jižně podél Nilu a pak k Čadskému jezeru, zatímco předkové Arabů Baggara a Abbala migrovali přes dnešní Libyi a Niger k Čadskému jezeru a dále do Súdánu (Cunnison 1966; Levy and Holl 2002; Zeltner 2002).

Autoři studie Enattah et al. 2008 přišli s hypotézou, že –13915*G se objevila v souvislosti s domestikací velblouda v Arábii před 6 000 lety (Enattah et al. 2008). Velbloudi byli ale nejprve chováni pro maso a mléko a teprve později pro přepravu předmětů určených k obchodování, především aromatických pryskyřic (kadidlo a myrha) ale i celé řady dalších artiklů, jež byly exportovány z jihoarabských přístavů během období karavanních království (Černý 2016). V době, kdy se velbloudi začali používat k transportu pouštními oblastmi Arábie, a zejména dále během migrací arabských kmenů do Afriky, mohla být mléčná produkce tohoto zvířete důležitější než v jeho počátcích. Je tedy možné, že odhad expanze mutace –13915*G ukazuje právě na období, kdy se beduini se stali více závislí na produkci velbloudího mléka.

Nemladší odhad pro expanzi –13915*G byl určen pro soubor Arabů Rašajda (219–312 let před současností). Tato data se v podstatě nerozcházejí historickými fakty, Rašajdové se totiž do Afriky dostali mnohem později než Arabové Baggara a Abbala, až

po roce 1860. Obrázek 25 znázorňuje navržené migrační trasy a výsledky odhadů, kdy došlo k expanzi –13915*G.



Obrázek 25: Odhad doby expanze –13915*G u populací jižní Arábie a u afrických Arabů Šípkami je vyznačená možná cesta, jíž se předkové Arabů Abbala a Baggara a Rašajda dostávali z Arábie do Afriky, čísla výsledky odhadu, I. př. s. – let před současností kdy se rozšířila –13915*G u Arabů Abbala a Baggara (ACH, ABA, ABG), u Arabů Rašajda (RAS), v západním Jemenu (YHG, YTI, YAC) a ománském Zufáru (DFR).

Při sloučení souboru západních Jemenců a Arabů Rašajda nám vyšlo období o něco mladší 939–1 233 let před současností. Vzhledem k historickým souvislostem, výsledkům Y chromozomální DNA (Nováčková 2016) a variabilitě pro-LP mutací je třeba předpokládat spíše nazávislý vývoj Rašajdů, proto výsledek po sloučení s Jemenci není pravděpodobně úplně relevantní.

Odhad stáří posledního společného předka –13915*G u souboru ze Saúdské Arábie podle Enattah et al. 2008 je $4\,095 \pm 2\,045$ let před současností. Metoda spojující odhad věku alely a rychlosti růstu (Austerlitz et al. 2003), které je použita v této disertační práci, odhaduje dobu, kdy se mutace poprvé objevila v populaci, ať už *de novo*, nebo prostřednictvím genového toku a zároveň expandovala. Takové výsledky nejsou v rozporu s výsledky studie Enattah et al. 2008, kde bylo odhadováno stáří posledního společného předka (MRCA), neboť mohou odrážet spíše demografické souvislosti.

Ve studii Bayoumi et al. 2016 bylo analyzováno 39 SNP ve 3 Mb dlouhém úseku v okolí -13915^*G včetně intronu 13 genu *MCM6* u souborů z Jemenu a Ománu (pro srovnání s analýzou prezentovanou v této disertační práci, v Bayoumi et al. 2016 bylo v úseku dlouhém 435 kb v okolí mutací -13910^*T a -13915^*G analyzováno 14 polymorfismů). Podle získaných haplotypů byla určena oblast vazebné nerovnováhy a rovněž odhadnuto stáří, kdy došlo k selekčnímu vymetení. Mutace -13915^*G byla ve vyšších frekvencích nalezena jen u souborů z Jemenu (57 %) a ze Zufáru (71 %). V okolí mutace byla prokázána dlouhá oblast homozygotity a doba, kdy pravděpodobně došlo k selekčnímu vymetení, byla odhadnuta na 4 300–5 000 let před současností u jemenské populace a 2 000–2 400 u populace ze Zufáru. Autoři studie se domnívají, že mutace -13915^*G by mohla pocházet z jižní Arábie, neboť jejich odhady doby, kdy začala působit pozitivní selekce na tuto alelu v Jemenu je starší než odhad na základě populace saúdských Arabů (Bayoumi et al. 2016; Enattah et al. 2008).

Hypotéza o šíření LP z jižní Arábie byla vyslovena již v práci Al-Abri et al. 2012b. Autoři ji podpořili faktem, že nejvyšší frekvence -13915^*G mezi jihoarabskými populacemi našli v Zufáru (Al-Abri et al. 2012b). Arábie je ostatně také místem, odkud do Afriky směřovalo již v minulosti před neolitem více migrací. Dokládá to např. mtDNA haploskupina R0a, dnes nejčastější mtDNA haploskupina v Arábii (Al-Abri et al. 2012a; Černý et al. 2011) Klady mtDNA haploskupiny HV1 – HV1a3 a HV1b1 mohou pak ukazovat na přesuny přes Rudé moře v obou směrech pravděpodobně v souvislosti s probíhajícím exportem obsidiánu z východní Afriky do jižní Arábie před 8 000 lety (Musilova et al. 2011; Černý 2016).

Naše výsledky pro populaci ze Zufáru ukazují rovněž na nejvyšší frekvenci -13915^*G z populací jižní Arábie (65,7 %), avšak odhad expanze je nižší. Je možné, že náš výsledek je zkreslen tím, že se jedná o populaci malou ~100 tisíc osob (podle Al-Abri et al. 2012b pak 250 tisíc osob) a částečně izolovanou od zbytku Ománu. Genetická diverzita tak mohla být snížena díky působení driftu, nicméně je rovněž možné, že v období před 250–350 lety, mohlo dojít k nějaké události, jež snížila efektivní velikost zufárské populace a zesílila selekci ve prospěch LP, respektive -13915^*G .

Metoda Austerlitz et al. 2003 spojuje odhad věku expanze mutace v populaci a odhad rychlosti růstu (Austerlitz et al. 2003). Tato metoda byla rovněž pro použita pro

mutaci -13910*T u populací střední Asie v práci Heyer et al. 2011. Zde byla u souboru kazašských pastevců zjištěna frekvence -13910*T 17 % a rychlost růstu 1,03; u usedlé populace Tádžiků a Uzbeků to bylo 10 % a rychlost růstu 1,02 (Heyer et al. 2011). Co se týče souborů analyzovaných v této disertační práci, nevyšší rychlost růstu byla zjištěna u Arabů Rašajda 2,9–4,7, nejnižší 1,2–1,3 pak u Arabů Baggara a Abbala. Námi změřené vyšší růstové rychlosti a vyšší frekvence pro-LP mutace -13915*G mohou poukazovat na selekci pro LP a důležitost konzumace čerstvého mléka u populací jižní Arábie, Arabů Baggara, Abbala a Rašajda. Výsledky ze střední Asie, kde jsou odhadované rychlosti nižší, mohou reflektovat zvyk konzumace kysaných mléčných výrobků s nízkým obsahem laktózy – selekční tlak na rozšíření pro-LP mutací tedy mohl působit méně.

Pozitivní selekce pro -13915*G mohla začít nezávisle v jednotlivých populacích nebo probíhat v jedné z lokálních populací, odkud se pak LP jedinci rozšířili do dalších populací, kde selekce začala tím pádem později. Stáří mutace by tak v příjmových populacích bylo nutně nižší, už jen z toho důvodu, že sem byla přenesena jen část okolní genetické variability z populace, kde mutace vznikla jako první.

Jedním z faktorů, který mohl ovlivnit výsledky uvedené v této práci, je počet použitých SNP. S větším počtem SNP na delším úseku, než je 419 kb by odhady byly patrně přesnější. Nicméně DNA, jež byla k dispozici, nebyla v odpovídající kvalitě pro rozsáhlejší analýzu. Např. vzorky z Jemenu jsou již jedenáct let staré buklíni stěry a vzorky Arabů Abbala dokonce třináct let. Přes jejich pečlivé uchování, DNA časem degraduje a její množství pro složitější analýzy tak není dostatečné. Přesto se lze domnívat, že informace získaná jejich analýzou odráží reálnou diverzitu výše uvedených polymorfismů a populací, byť jistě s rozlišením nižším, než mají k dispozici jiné výzkumné týmy.

Dalším tématem k diskuzi je velikost současné populace, jež se používá při výpočtu odhadu stáří alely a rychlosti růstu (Austerlitz et al. 2003). Námi uváděné populační velikosti (pozor metoda nepracuje s efektivními, ale nominálními velikostmi) jsou zprůměrované hodnoty, které byly v roce 2015 uvedeny veřejně dostupnými zdroji jako je internetová platforma Ethnologue (Lewis and Simons 2015) nebo Joshua projekt (www.joshuaproject.net). Není ale pochyb o tom, že i v dnešní době je velmi složité odhadnout skutečnou velikost kočovných populací, proto uvedená data mohou být

nepřesná. Na druhé straně ale, jak již bylo ukázáno ve studii LP u populací střední Asie, tento parametr má na výsledek výpočtu spíše minoritní vliv (Heyer et al. 2011).

Pro ověření výsledků týkajících se relativně mladé expanze -13915^*G by bylo užitečné získat aDNA z pravěkých, starověkých a středověkých populací Arábie a Afriky. Na příkladu evropské populace je totiž docela dobře patné, že mutace -13910^*T se nešířila již v eneolitu, jak by se dalo předpokládat na základě Bayesovských kalkulací nebo archeologických předpokladů (Itan et al. 2009), ale jak skutečně ukazují aDNA data, vyšších frekvencí dosáhla teprve až ve středověku (Burger et al. 2007; Kruttl et al. 2014; Plantinga et al. 2012; Witas et al. 2015). Takovéto srovnání pro mutaci -13915^*G nemusí být příliš vzdálenou budoucností (Almathen et al. 2016).

Lze tedy konstatovat, že výsledky odhadu expanze mutace -13915^*G pro soubor ze západního Jemenu a pro soubory afrických Arabů v této dizertaci jsou v souladu s dosavadními poznatky o počátcích a šíření LP v Arábii. Alela -13915^*G vznikla podle všech dostupných dat v Arábii, ale v samotném místě vzniku a dále do Afriky se začala šířit až v rámci pozdějších, historicky doložitelných migrací. Zjištěná doba expanze -13915^*G před zhruba 1 500 lety v západním Jemenu a před 300 lety v Zufáru, nemusí být v přímém rozporu s dříve publikovanými daty (Bayoumi et al. 2016; Enattah et al. 2008). Použitá metoda v této dizertaci spojující odhad věku alely s rychlostí jejího růstu (Austerlitz et al. 2003) může naopak lépe reflektovat proběhlé demografické události a vhodně dokreslit celkový obraz historie arabských populací na území Arábie a Afriky. Předpoklad, že -13915^*G má svůj původ právě v jižní Arábii (Bayoumi et al. 2016), nelze na základě zde získaných dat potvrdit ani vyvrátit. Nicméně výsledky by mohly být v souladu s hypotézou (Enattah et al. 2008), že -13915^*G souvisí s domestikací velblouda. Vyšší podíl této varianty nacházíme právě u populací afrických Arabů, kteří se dosud zabývají chovem velbloudů než u těch, jež přešli na chov hovězího dobytka.

4 Závěr

Na LP lze pohlížet z mnoha různých úhlů, lze studovat fyziologii produkce LPH v tenkém střevě nebo regulaci produkce LPH na úrovni DNA a RNA. Dají se rovněž studovat vlivy prostředí či kultury, které se podílely na rozšíření LP. Studium LP jako příkladu pozitivní selekce proběhlé v lidském genomu během několika desítek či stovek generací, se můžeme dozvědět něco o mechanismech tohoto procesu v lidské populaci. Na základě haplotypových studií se pak dá odhadnout, jak se v minulosti šířily pro-LP mutace v rámci jednotlivých populací.

V této disertační práci byla studována LP u afrických Arabů v jižní Arábii. Jižní Arábie je místem kam sice neolitické znalosti pronikly z Předního východu, nicméně následný vývoj neolitu byl zřejmě do značné míry nezávislý. Stejně tak jako tomu bylo v subsaharské Africe, kde využití domestikovaných zvířat předchází domestikaci rostlin. Chov hovězího dobytka, ovcí a koz a později velbloudů byl velmi významnou součástí subsistence zdejších obyvatel jak v Arábii tak Africe. Arábie jako taková je rovněž místem, kde byly v předchozích studiích zjištěny vysoké frekvence osob s LP a majoritně se vyskytující pro-LP mutací je -13915^*G . Bylo zjištěno, že ta se vyskytuje i některých populací v Africe, nejvíce pak těch s arabským původem. Arábie tak byla pravděpodobně místem, kde tato mutace vznikla a do Afriky se mohla šířit s migracemi arabských beduínů probíhajícími od 7. století v souvislosti s rozpadem jihoarabských karavanních království a šířením islámu.

Výsledky uvedené v této disertační práci se nerozcházejí s teorií arabského původu -13915^*G , neboť ta byla zastoupena jako jediná pro-LP mutace u všech zkoumaných souborů. U většiny souborů afrických Arabů byly nalezeny nižší frekvence -13915^*G než u souborů z jižní Arábie, naproti tomu u souborů afrických Arabů nacházíme větší podíl dalších pro-LP variant svědčících o proběhlém genovém toku. Výjimkou jsou Arabové Rašajda žijící ve východním Súdánu, kteří mají ze všech doposud analyzovaných afrických i arabských populací nejvyšší frekvenci -13915^*G – 76 %. Naopak soubor Jemenců z oblasti Hadramawt má ze všech souborů jižní Arábie nejnižší frekvenci -13915^*G – 25 % a podobá se tím spíše africkým Arabům, u kterých je (s výjimkou výše uvedených Rašajdů) výskyt -13915^*G nižší než 50 %; u všech ostatních jihoarabských souborů je to více než 50 %. Jak bylo zjištěno v předchozích studiích, i skladbou mtDNA haploskupin se hadramawtský soubor podobá spíše

subsaharským než okolním arabským populacím. Vysvětlením může být imigrace afrických žen z tzv. hadramí diapor, zakládaných v Africe (i jinde) muži z Hadramawtu, jež je nezávisle popsána v řadě antropologických a sociologických studií. Potvrzení takovéto hypotézy by však vyžadovalo osobních dat, která pro populačně genetické výzkumy nejsou k dispozici.

Zjištěná data hovoří rovněž ve prospěch teorie, že vnik a šíření -13915^*G souvisí s domestikací velblouda a jeho využíváním pro mléčné hospodářství v Arábii. Nevyšší alelické frekvence -13915^*G u afrických Arabů nalézáme u tradičních pastevců velbloudů – Arabů Abbala z Čadu (44,4 %) a Rašajda ze Súdánu (76 %), zatímco u Arabů Baggara, kteří po své migraci do Afriky pravděpodobně přešli k chovu hovězího dobytka, jsou frekvence -13915^*G nižší (19,8 % u Baggarů ze Súdánu a 25,5 % u Baggarů z Čadu).

Výsledky rovněž ukazují, že mutace -13915^*G se dostala do Afriky v rámci historicky doložených migrací z Arábie. Stáří její expanze u jemenských populací je zhruba 1 500 let před současností a o něco málo mladší je expanze -13915^*G afrických Arabů Abbala a Baggara – zhruba 1 450 let před současností. Tato data zřejmě souvisí s rozpadem karavanních království přibližně v 6. století, kdy část beduinů přepravujících kadidlo a myrhu z jižní Arábie přišla o svou původní obživu a produkce a konzumace velbloudího mléka se pro ně stala důležitější než dříve. Od 7. století n. l. rovněž začínají výraznější migrace z Arábie do Afriky, s nimiž sem pravděpodobně přišli také předkové dnešních Arabů Abbala a Baggara. Expanze mutace -13915^*G u súdánských Arabů Rašajda byla spočtena jen na 250 let před současností, což se rovněž výrazně nerozchází s historickými fakty, neboť jejich předkové přišli z Arábie do Afriky dle všech dostupných dokladů až po roce 1860 našeho letopočtu. Zjištěné výsledky tak ukazují, jak lze díky genetické podstatě LP sledovat kromě subsistence i proběhlé migrační trasy a genový tok.

Stále však zůstává řada nezodpovězených otázek. Nelze např. zcela jednoznačně odpovědět na to, jaká byla vlastně příčina šíření LP v jednotlivých lidských populacích a zda jsou tyto příčiny různé, či je jen jedna, nebo zda se jedná o komplex několika impulzů, jež mohly přijít zároveň či postupně. Při hledání odpovědí se vědci snaží zjistit, kdy se vlastně LP začala šířit v těch či oněch populacích a zaměřují se na analýzu haplotypu obklopujícího úsek s pro-LP mutacemi. Nové světlo do problému pomalu

vnáší také analýza aDNA. Výsledky aDNA v z evropských nalezišť ukazují, že LP se ve větší frekvenci objevuje mnohem později, než bylo odhadováno na základě analýz DNA současných populací a demografických modelů. Lidská DNA z aridních oblastí jako je Arábie, Sahara a sahel zatím nebyla úspěšně izolována, nicméně jak je patrné na studii domestikace velblouda, kde autoři izolovali DNA ze 7 000 let starých ostatků dromedárů z Arábie a Předního východu (Almathen et al. 2016), je jen otázkou času jaké další informace o šíření LP v těchto oblastech z aDNA získáme.

Seznam použitých zkratek

A adenosin

aDNA archaická DNA

AMOVA *analysis of molecular variance*, analýza molekulárního rozptylu

ASD *average square distance method*

BHT *breath hydrogen test*

bp bázevý pár

C cytosin

CaBP *calcium binding protein*

Cdx-2 *caudal-type homeobox transcription factor 2*

CREs *cis-regulatory elements*, cis-regulační elementy

EHH *extended haplotype homozygosity*

Fox *forkhead box*

F_{ST} F statistika

G guanin

GATA *gata-binding protein*

HNF *hepatocyte nuclear factor*

HRM *high resolution melting*, vysokorozlišovací analýza křivek tání

HVS-1 hypervariabilní segment 1 mitochondriální DNA

H-W Hardy-Weinbergova

kb kilo báze

LBK *Linearbankeramik*, kultura s lineární keramikou

LC480 LightCycler 480

LC96 LightCycler 96

LCT gen pro LPH

LP laktázová persistence

LPH laktáza-phlorizin hydroláza

LTT *lactose tolerance test*

MCM6 *minichromosome maintenance gene 6*

MIS *marine isotope stage*

mRNA *messenger RNA*, mediátorová RNA

mtDNA mitochondriální DNA

n. l. našeho letopočtu

Oct-1 *octamer-binding transcription factor 1*

ODEM odhad doby expanze mutace

PCoA *principal coordinates analysis* analýza hlavních koordinát

PCR *polymerase chain reaction*, polymerázová řetězová reakce

rs *reference SNP ID*, referenční číslo polymorfismu

SNP *single nucleotide polymorphism*, jednobodový polymorfismus

str. strana

T tymin

Použitá literatura

- Abbott WG, and Tasman-Jones C. 1985. Incidence of acquired primary hypolactasia in three New Zealand racial groups. *N Z Med J* 98(776):228-229.
- Abrams SA, Griffin IJ, and Davila PM. 2002. Calcium and zinc absorption from lactose-containing and lactose-free infant formulas. *Am J Clin Nutr* 76(2):442-446.
- Al-Abri A, Podgorna E, Rose JI, Pereira L, Mulligan CJ, Silva NM, Bayoumi R, Soares P, and Cerny V. 2012a. Pleistocene-Holocene boundary in Southern Arabia from the perspective of human mtDNA variation. *American Journal of Physical Anthropology* 149(2):291-298.
- Al-Abri AR, Al-Rawas O, Al-Yahyaee S, Al-Habori M, Al-Zubairi AS, and Bayoumi R. 2012b. Distribution of the lactase persistence-associated variant alleles -13910* T and -13915* G among the people of Oman and Yemen. *Hum Biol* 84(3):271-286.
- Almathen F, Charruau P, Mohandesan E, Mwacharo JM, Orozco-terWengel P, Pitt D, Abdussamad AM, Uerpmann M, Uerpmann HP, De Cupere B et al. . 2016. Ancient and modern DNA reveal dynamics of domestication and cross-continental dispersal of the dromedary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(24):6707-6712.
- Aoki K. 1986. A stochastic model of gene-culture coevolution suggested by the "culture historical hypothesis" for the evolution of adult lactose absorption in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(9):2929-2933.
- Arnold J, Diop M, Kodjovi M, and Rozier J. 1980. Lactose intolerance in adults in Senegal. *C R Seances Soc Biol Fil* 174(6):983-992.
- Arola H. 1994. Diagnosis of hypolactasia and lactose malabsorption. *Scand J Gastroenterol Suppl* 202:26-35.
- Austerlitz F, Kalaydjieva L, and Heyer E. 2003. Detecting population growth, selection and inherited fertility from haplotypic data in humans. *Genetics* 165(3):1579-1586.
- Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA, Abecasis GR et al. . 2015. A global reference for human genetic variation. *Nature* 526(7571):68-74.
- Bairoch A. 2000. The ENZYME database in 2000. *Nucleic Acids Res* 28(1):304-305.
- Balaresque P, Bowden GR, Adams SM, Leung HY, King TE, Rosser ZH, Goodwin J, Moisan JP, Richard C, Millward A et al. . 2010. A Predominantly Neolithic Origin for European Paternal Lineages. *Plos Biology* 8(1):9.
- Balasse M, and Tresset A. 2002. Early weaning of Neolithic domestic cattle (Bercy, France) revealed by intra-tooth variation in nitrogen isotope ratios. *Journal of Archaeological Science* 29(8):853-859.
- Bar-Yosef O. 1998. The Natufian culture in the Levant, threshold to the origins of agriculture. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews* 6(5):159-177.
- Batchelor AJ, and Compston JE. 1983. Reduced plasma half-life of radio-labelled 25-hydroxyvitamin D3 in subjects receiving a high-fibre diet. *Br J Nutr* 49(2):213-216.

- Bayoumi R, De Fanti S, Sazzini M, Giuliani C, Quagliariello A, Bortolini E, Boattini A, Al-Habori M, Al-Zubairi AS, Rose JI et al. . 2016. Positive selection of lactase persistence among people of Southern Arabia. *Am J Phys Anthropol* 161(4):676-684.
- Beech M, Mashkour M, Huels M, and Zazzo A. 2008. Prehistoric camels in south-eastern Arabia: the discovery of a new site in Abu Dhabi's Western Region, United Arab Emirates. *Seminar for Arabian Studies*. London: Archaeopress Oxford. p 17-30.
- Behar DM, Thomas MG, Skorecki K, Hammer MF, Bulygina E, Rosengarten D, Jones AL, Held K, Moses V, Goldstein D et al. . 2003. Multiple origins of Ashkenazi Levites: Y chromosome evidence for both Near Eastern and European ancestries. *Am J Hum Genet* 73(4):768-779.
- Beja-Pereira A, Luikart G, England PR, Bradley DG, Jann OC, Bertorelle G, Chamberlain AT, Nunes TP, Metodiev S, Ferrand N et al. . 2003. Gene-culture coevolution between cattle milk protein genes and human lactase genes. *Nat Genet* 35(4):311-313.
- Belitz HD, Grosch W, and Schieberle P. 2009. *Food Chemistry*: Springer Berlin Heidelberg.
- Bernardes-Silva CF, Pereira AC, da Mota GDA, Krieger JE, and Laudanna AA. 2007. Lactase persistence/non-persistence variants, C/T_13910 and G/A_22018, as a diagnostic tool for lactose intolerance in IBS patients. *Clinica Chimica Acta* 386(1-2):7-11.
- Bersaglieri T, Sabeti PC, Patterson N, Vanderploeg T, Schaffner SF, Drake JA, Rhodes M, Reich DE, and Hirschhorn JN. 2004. Genetic signatures of strong recent positive selection at the lactase gene. *Am J Hum Genet* 74(6):1111-1120.
- Brand JC, Gracey MS, Spargo RM, and Dutton SP. 1983. LACTOSE-MALABSORPTION IN AUSTRALIAN ABORIGINES. *American Journal of Clinical Nutrition* 37(3):449-452.
- Breton G, Schlebusch CM, Lombard M, Sjödin P, Soodyall H, and Jakobsson M. 2014. Lactase persistence alleles reveal partial East African ancestry of southern African Khoe pastoralists. *Curr Biol* 24(8):852-858.
- Burger J, Kirchner M, Bramanti B, Haak W, and Thomas MG. 2007. Absence of the lactase-persistence-associated allele in early Neolithic Europeans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(10):3736-3741.
- Cílek V, and Pokorný P. 2016. Přílivy a odlivy pouští. In: Pokorný P, editor. *Afrika zevnitř Kontinentem sucha a věčných proměn*. Praha: Academia. p 30-50.
- Cílek V. 2016. Afrika mezi nadějí a beznadějí. In: Pokorný P, editor. *Afrika zevnitř Kontinentem sucha a věčných proměn*. Praha: Academia. p 319-329.
- Číperová M, Pavelka J, and Šmejda L. 2015. Detekce stop mléka v porézní keramice z neolitu jihozápadních Čech a otázka trávení laktózy u evropských populací v minulosti. *Acta FF ZČU* 2(7):193-211.
- Coelho M, Luiselli D, Bertorelle G, Lopes AI, Seixas S, Destro-Bisol G, and Rocha J. 2005. Microsatellite variation and evolution of human lactase persistence. *Hum Genet* 117(4):329-339.
- Coelho M, Sequeira F, Luiselli D, Beleza S, and Rocha J. 2009. On the edge of Bantu expansions: mtDNA, Y chromosome and lactase persistence genetic variation in southwestern Angola. *BMC Evol Biol* 9:80.

- Consortium IH. 2003. The International HapMap Project. *Nature* 426(6968):789-796.
- Cook GC, and al-Torki MT. 1975. High intestinal lactase concentrations in adult Arabs in Saudi Arabia. *Br Med J* 3(5976):135-136.
- Copley MS, Berstan R, Dudd SN, Docherty G, Mukherjee AJ, Straker V, Payne S, and Evershed RP. 2003. Direct chemical evidence for widespread dairying in prehistoric Britain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(4):1524-1529.
- Craig O, Chapman J, Heron C, Willis L, Bartosiewicz L, Taylor G, Whittle A, and Collins M. 2005. Did the first farmers of central and eastern Europe produce dairy foods? *Antiquity* 79(306):882-894.
- Cunnison I. 1966. *Baggara Arabs: Power And Lineage In A Sudanese Nomad Tribe*. Oxford: Oxford University Press.
- Černý V, Čížková M, Poloni ES, Al-Meerī A, and Mulligan CJ. 2016. Comprehensive view of the population history of Arabia as inferred by mtDNA variation. *Am J Phys Anthropol* 159(4):607-616.
- Černý V, Mulligan CJ, Fernandes V, Silva NM, Alshamali F, Non A, Harich N, Cherni L, El Gaaied AB, Al-Meerī A et al. . 2011. Internal diversification of mitochondrial haplogroup R0a reveals post-last glacial maximum demographic expansions in South Arabia. *Mol Biol Evol* 28(1):71-78.
- Černý V, Mulligan CJ, Rídl J, Zaloudková M, Edens CM, Hájek M, and Pereira L. 2008. Regional differences in the distribution of the sub-Saharan, West Eurasian, and South Asian mtDNA lineages in Yemen. *Am J Phys Anthropol* 136(2):128-137.
- Černý V, Pereira L, Kujanová M, Vasíková A, Hájek M, Morris M, and Mulligan CJ. 2009. Out of Arabia-the settlement of island Soqatra as revealed by mitochondrial and Y chromosome genetic diversity. *Am J Phys Anthropol* 138(4):439-447.
- Černý V, Salas A, Hájek M, Zaloudková M, and Brdicka R. 2007. A bidirectional corridor in the Sahel-Sudan belt and the distinctive features of the Chad Basin populations: a history revealed by the mitochondrial DNA genome. *Ann Hum Genet* 71(Pt 4):433-452.
- Černý V. 2006. *Lidé od Čadského jezera*. Praha: Academia.
- Černý V. 2016. *Po stopách 'Ádů*. Praha: Academia.
- de Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, and Schrezenmeir J. 2001. Probiotics--compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr* 73(2 Suppl):421S-429S.
- Drake NA, Blench RM, Armitage SJ, Bristow CS, and White KH. 2011. Ancient watercourses and biogeography of the Sahara explain the peopling of the desert. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(2):458-462.
- Drechsler P. 2007. The Neolithic dispersal into Arabia. *Proceedings of the Seminar for Arabian Studies* 37:93-109.
- Dunne J, Evershed RP, Salque M, Cramp L, Bruni S, Ryan K, Biagetti S, and di Lernia S. 2012. First dairying in green Saharan Africa in the fifth millennium BC. *Nature* 486(7403):390-394.
- Dysonhudson R, and Dysonhudson N. 1980. NOMADIC PASTORALISM. *Annual Review of Anthropology* 9:15-61.

- Enattah N, Jensen T, Nielsen M, Lewinski R, Kuokkanen M, Rasinpera H, El-Shanti H, Seo J, Alifrangis M, Khalil I et al. . 2008. Independent introduction of two lactase-persistence alleles into human populations reflects different history of adaptation to milk culture. *Am J Hum Genet* 82(1):57-72.
- Enattah NS, Sahi T, Savilahti E, Terwilliger JD, Peltonen L, and Järvelä I. 2002. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nat Genet* 30(2):233-237.
- Evershed RP, Payne S, Sherratt AG, Copley MS, Coolidge J, Urem-Kotsu D, Kotsakis K, Ozdogan M, Ozdogan AE, Nieuwenhuys O et al. . 2008. Earliest date for milk use in the Near East and southeastern Europe linked to cattle herding. *Nature* 455(7212):528-531.
- Fedele FG. 2009. Early Holocene in the Highlands: Data on the Peopling of the Eastern Yemen Plateau, with a Note on the Pleistocene Evidence. In: Petraglia MD, and Rose JJ, editors. *The evolution of human populations in Arabia: Paleoenvironments, prehistory and genetics*. New York: Springer. p 215-236.
- Fernandes V, Triska P, Pereira JB, Alshamali F, Rito T, Machado A, Fajkosova Z, Cavadas B, Cerny V, Soares P et al. . 2015. Genetic Stratigraphy of Key Demographic Events in Arabia. *Plos One* 10(3):27.
- Flannery KV. 1973. ORIGINS OF AGRICULTURE. *Annual Review of Anthropology* 2:271-310.
- Flatz G, and Rotthauwe HW. 1973. Lactose nutrition and natural selection. *Lancet* 2(7820):76-77.
- Flegr J. 2009. *Evoluční biologie*. Praha: Academia.
- Friedrich DC, Callegari-Jacques SM, Petzl-Erler ML, Tsuneto L, Salzano FM, and Hutz MH. 2012. Stability or variation? Patterns of lactase gene and its enhancer region distributions in Brazilian Amerindians. *American Journal of Physical Anthropology* 147(3):427-432.
- Gallego Romero I, Basu Mallick C, Liebert A, Crivellaro F, Chaubey G, Itan Y, Metspalu M, Eaaswarkhanth M, Pitchappan R, Villems R et al. . 2012. Herders of Indian and European cattle share their predominant allele for lactase persistence. *Mol Biol Evol* 29(1):249-260.
- Gamba C, Jones ER, Teasdale MD, McLaughlin RL, Gonzalez-Fortes G, Mattiangeli V, Domboróczki L, Kóvári I, Pap I, Anders A et al. . 2014. Genome flux and stasis in a five millennium transect of European prehistory. *Nat Commun* 5:5257.
- Gerbault P, Liebert A, Itan Y, Powell A, Currat M, Burger J, Swallow DM, and Thomas MG. 2011. Evolution of lactase persistence: an example of human niche construction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1566):863-877.
- Gerbault P, Moret C, Currat M, and Sanchez-Mazas A. 2009. Impact of selection and demography on the diffusion of lactase persistence. *PLoS One* 4(7):e6369.
- Gerbault P, Roffet-Salque M, Evershed RP, and Thomas MG. 2013. How long have adult humans been consuming milk? *IUBMB Life* 65(12):983-990.
- Gerbault P. 2013. The onset of lactase persistence in Europe. *Hum Hered* 76(3-4):154-161.
- Gifford-Gonzalez D, and Hanotte O. 2011. Domesticating Animals in Africa: Implications of Genetic and Archaeological Findings. *Journal of World Prehistory* 24(1):1-23.

- Gifford-Gonzalez D. 2005. Pastoralism and its Consequences. In: Stahl AB, editor. *African Archaeology A Critical Introduction*. Malden: Blackwell Publishing Ltd. p 187-224.
- Glew RH, Crossey MJ, Polanams J, Okolie HI, and VanderJagt DJ. 2010. Vitamin D status of seminomadic Fulani men and women. *J Natl Med Assoc* 102(6):485-490.
- Glew RH, Williams M, Conn CA, Cadena SM, Crossey M, Okolo SN, and VanderJagt DJ. 2001. Cardiovascular disease risk factors and diet of Fulani pastoralists of northern Nigeria. *Am J Clin Nutr* 74(6):730-736.
- Gosch C, Halbwirth H, and Stich K. 2010. Phloridzin: biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants. *Phytochemistry* 71(8-9):838-843.
- Green RJ, Samy G, Miqdady MS, El-Hodhod M, Akinyinka OO, Saleh G, Haddad J, Alsaedi SA, Mersal AY, Edris A et al. . 2015. Vitamin D deficiency and insufficiency in Africa and the Middle East, despite year-round sunny days. *S Afr Med J* 105(7):603-605.
- Greenfield HJ. 2010. The Secondary Products Revolution: the past, the present and the future. *World Archaeology* 42(1):29-54.
- Guéguen L, and Pointillart A. 2000. The bioavailability of dietary calcium. *J Am Coll Nutr* 19(2 Suppl):119S-136S.
- Hall TA. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT/2K/XP/7. Carlsbad: Ibis Biosciences.
- Harrower MJ. 2008. Hydrology, ideology, and the origins of irrigation in ancient Southwest Arabia. *Current Anthropology* 49(3):497-510.
- Harvey CB, Hollox EJ, Poulter M, Wang Y, Rossi M, Auricchio S, Iqbal TH, Cooper BT, Barton R, Sarner M et al. . 1998. Lactase haplotype frequencies in Caucasians: association with the lactase persistence/non-persistence polymorphism. *Ann Hum Genet* 62(Pt 3):215-223.
- Hassan HY, van Erp A, Jaeger M, Tahir H, Oosting M, Joosten LA, and Netea MG. 2016. Genetic diversity of lactase persistence in East African populations. *BMC Res Notes* 9:8.
- Helmer D, Gourichon L, Monchot H, Peters J, and Sana Segui M. 2005. Identifying early domestic cattle from Pre-Pottery Neolithic sites on the Middle Euphrates using sexual dimorphism. In: Vigne JD, Peters J, and Helmer D, editors. *First Steps of Animal Domestication New archaeozoological approaches*. Oxford: Oxbow Books 2005. p 86-95.
- Heyer E, Brazier L, Ségurel L, Hegay T, Austerlitz F, Quintana-Murci L, Georges M, Pasquet P, and Veuille M. 2011. Lactase persistence in central Asia: phenotype, genotype, and evolution. *Hum Biol* 83(3):379-392.
- Holden C, and Mace R. 1997. Phylogenetic analysis of the evolution of lactose digestion in adults. *Hum Biol* 69(5):605-628.
- Holden C, and Mace R. 2002. Pastoralism and the evolution of lactase persistence. In: Leonard W, and Crawford H, editors. *Human Biology and Pastoral Populations*. Cambridge: Cambridge University Press. p 280-307.
- Hollox EJ, Poulter M, Zvarik M, Ferak V, Krause A, Jenkins T, Saha N, Kozlov AI, and Swallow DM. 2001. Lactase haplotype diversity in the Old World. *Am J Hum Genet* 68(1):160-172.
- Chaudhry KK, Mahmood S, and Mahmood A. 2008. Hormone induced expression of brush border lactase in suckling rat intestine. *Mol Cell Biochem* 312(1-2):11-16.

- Childe GV. 1953. *New Light on the Most Ancient East*. New York: F. A. Praeger. 255 p.
- Intiaz F, Savilahti E, Sarnesto A, Trabzuni D, Al-Kahtani K, Kagevi I, Rashed MS, Meyer BF, and Järvelä I. 2007. The T/G 13915 variant upstream of the lactase gene (LCT) is the founder allele of lactase persistence in an urban Saudi population. *J Med Genet* 44(10):e89.
- Ingram CJ, Elamin MF, Mulcare CA, Weale ME, Tarekegn A, Raga TO, Bekele E, Elamin FM, Thomas MG, Bradman N et al. . 2007. A novel polymorphism associated with lactose tolerance in Africa: multiple causes for lactase persistence? *Hum Genet* 120(6):779-788.
- Ingram CJ, Mulcare CA, Itan Y, Thomas MG, and Swallow DM. 2009a. Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence. *Hum Genet* 124(6):579-591.
- Ingram CJ, Raga TO, Tarekegn A, Browning SL, Elamin MF, Bekele E, Thomas MG, Weale ME, Bradman N, and Swallow DM. 2009b. Multiple rare variants as a cause of a common phenotype: several different lactase persistence associated alleles in a single ethnic group. *J Mol Evol* 69(6):579-588.
- Itan Y, Jones BL, Ingram CJ, Swallow DM, and Thomas MG. 2010. A worldwide correlation of lactase persistence phenotype and genotypes. *BMC Evol Biol* 10:36.
- Itan Y, Powell A, Beaumont MA, Burger J, and Thomas MG. 2009. The origins of lactase persistence in Europe. *PLoS Comput Biol* 5(8):e1000491.
- Järvelä I, Torniainen S, and Kolho KL. 2009. Molecular genetics of human lactase deficiencies. *Ann Med* 41(8):568-575.
- Jensen TG, Liebert A, Lewinsky R, Swallow DM, Olsen J, and Troelsen JT. 2011. The -14010*C variant associated with lactase persistence is located between an Oct-1 and HNF1 α binding site and increases lactase promoter activity. *Hum Genet* 130(4):483-493.
- Jesse F, Keding B, Lenssen-Erz T, and Pöllath N. 2013. I Hope Your Cattle Are Well' Archaeological Evidence for Early Cattle-centred Behaviour in the Eastern Sahara of Sudan and Chad. In: Bollig M, Schnegg M, and Wotzka HP, editors. *Pastoralism in Africa: Past, Present and Future*. New York: Berghan Books. p 66-103.
- Jobling M, Hollox E, Hurles M, Kivisild T, and Tyler-Smith C. 2013. *Human Evolutionary Genetics*. 2nd ed. New York, USA: Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Jones BL, Oljira T, Liebert A, Zmarz P, Montalva N, Tarekeyn A, Ekong R, Thomas MG, Bekele E, Bradman N et al. . 2015. Diversity of lactase persistence in African milk drinkers. *Hum Genet* 134(8):917-925.
- Jones BL, Raga TO, Liebert A, Zmarz P, Bekele E, Danielsen ET, Olsen AK, Bradman N, Troelsen JT, and Swallow DM. 2013. Diversity of lactase persistence alleles in Ethiopia: signature of a soft selective sweep. *Am J Hum Genet* 93(3):538-544.
- Keusch GT, Troncale FJ, Miller LH, Promadhat V, and Anderson PR. 1969. Acquired lactose malabsorption in Thai children. *Pediatrics* 43(4):540-545.
- Khabarova Y, Torniainen S, Savilahti E, Isokoski M, Mattila K, and Järvelä I. 2010. The -13914G>A variant upstream of the lactase gene (LCT) is associated with lactase persistence/non-persistence. *Scand J Clin Lab Invest* 70(5):354-357.

- Kovačiková L, Brehard S, Sumberova R, Balasse M, and Tresset A. 2012. The new insights into the subsistence and early farming from neolithic settlements in Central Europe: the archaeozoological evidence from the Czech Republic. *Archaeofauna* 21:71-97.
- Kruttli A, Bouwman A, Akgul G, Della Casa P, Ruhli F, and Warinner C. 2014. Ancient DNA Analysis Reveals High Frequency of European Lactase Persistence Allele (T-13910) in Medieval Central Europe. *Plos One* 9(1).
- Kyselý R. 2010. Archeozoologická problematika eneolitu Čech: Univerzita Karlova.
- Labrie V, Buske OJ, Oh E, Jeremian R, Ptak C, Gasiūnas G, Maleckas A, Petereit R, Žvirbliene A, Adamonis K et al. . 2016. Lactase nonpersistence is directed by DNA-variation-dependent epigenetic aging. *Nat Struct Mol Biol* 23(6):566-573.
- Lacan M, Keyser C, Ricaut FX, Brucato N, Duranthon F, Guilaine J, Crubézy E, and Ludes B. 2011a. Ancient DNA reveals male diffusion through the Neolithic Mediterranean route. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(24):9788-9791.
- Lacan M, Keyser C, Ricaut FX, Brucato N, Tarrús J, Bosch A, Guilaine J, Crubézy E, and Ludes B. 2011b. Ancient DNA suggests the leading role played by men in the Neolithic dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(45):18255-18259.
- Lazaridis I, Nadel D, Rollefson G, Merrett DC, Rohland N, Mallick S, Fernandes D, Novak M, Gamarra B, Sirak K et al. . 2016. Genomic insights into the origin of farming in the ancient Near East. *Nature* 536(7617):419-+.
- Lengemann FW, Wasserman RH, and Comar CL. 1959. Studies on the enhancement of radiocalcium and radiostrontium absorption by lactose in the rat. *J Nutr* 68(3):443-456.
- Leonardi M, Gerbault P, Thomas MG, and Burger J. 2012. The evolution of lactase persistence in Europe. A synthesis of archaeological and genetic evidence. *International Dairy Journal* 22(2):88-97.
- Levy TE, and Holl AFC. 2002. Migrations, ethnogenesis, and settlement dynamics: Israelites in Iron Age Canaan and Shuwa-Arabs in the Chad Basin. *Journal of Anthropological Archaeology* 21(1):83-118.
- Lewinsky RH, Jensen TG, Møller J, Stensballe A, Olsen J, and Troelsen JT. 2005. T-13910 DNA variant associated with lactase persistence interacts with Oct-1 and stimulates lactase promoter activity in vitro. *Hum Mol Genet* 14(24):3945-3953.
- Lewis MP, and Simons GF. 2015. *Ethnologue: Languages of the World*. In: Fennig CD, editor. 18 ed. Dallas, Texas: SIL International.
- Liebert A, Jones BL, Danielsen ET, Olsen AK, Swallow DM, and Troelsen JT. 2016. In Vitro Functional Analyses of Infrequent Nucleotide Variants in the Lactase Enhancer Reveal Different Molecular Routes to Increased Lactase Promoter Activity and Lactase Persistence. *Ann Hum Genet* 80(6):307-318.
- Liebert A. 2012. The Milkybars are on Me Lactase persistence and its traces within DNA. May contain traces of milk - Investigating the role of dairy farming and milk consumption in the European Neolithic. York. p 75-88.
- Lokki AI, Järvelä I, Israelsson E, Maiga B, Troye-Blomberg M, Dolo A, Doumbo OK, Meri S, and Holmberg V. 2011. Lactase persistence genotypes and malaria susceptibility in Fulani of Mali. *Malar J* 10:9.
- Malmström H, Linderholm A, Lidén K, Storå J, Molnar P, Holmlund G, Jakobsson M, and Götherström A. 2010. High frequency of lactose intolerance in a prehistoric hunter-gatherer population in northern Europe. *BMC Evol Biol* 10:89.

- Manger LO. 2010. The Hadrami diaspora: community-building on the Indian Ocean rim. New York: Berghahn Books.
- Marshall F, and Hildebrand E. 2002. Cattle before crops: The beginnings of food production in Africa. *Journal of World Prehistory* 16(2):99-143.
- Matthews SB, Waud JP, Roberts AG, and Campbell AK. 2005. Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *Postgrad Med J* 81(953):167-173.
- McCorriston J, and Martin L. 2009. Southern Arabia's early pastoral population history: Some recent evidence. In: Petraglia MD, and Rose JI, editors. *The evolution of human populations in Arabia Paleoenvironments, prehistory and genetics*. New York: Springer. p 237-250.
- McCracken RD. 1971. Lactase deficiency - example of dietary evolution. *Current Anthropology* 12(45):479-497.
- Mulcare CA, Weale ME, Jones AL, Connell B, Zeitlyn D, Tarekegn A, Swallow DM, Bradman N, and Thomas MG. 2004. The T allele of a single-nucleotide polymorphism 13.9 kb upstream of the lactase gene (LCT) (C-13.9kbT) does not predict or cause the lactase-persistence phenotype in Africans. *Am J Hum Genet* 74(6):1102-1110.
- Musilova E, Fernandes V, Silva NM, Soares P, Alshamali F, Harich N, Cherni L, El Gaaied AB, Al-Meerri A, Pereira L et al. . 2011. Population History of the Red Sea - Genetic Exchanges Between the Arabian Peninsula and East Africa Signaled in the Mitochondria! DNA HV1 Haplogroup. *American Journal of Physical Anthropology* 145(4):592-598.
- Neustupný E, editor. 2008. *Archeologie pravěkých Čech 4. Eneolit: Archeologický ústav AV ČR, Praha, v. v. i.*
- Nováčková J. 2016. *Vplyv geografie a subsistencie na distribúciu haploskupín chromozómu Y v Európe a Afrike: Univerzita Karlova.*
- Olds LC, and Sibley E. 2003. Lactase persistence DNA variant enhances lactase promoter activity in vitro: functional role as a cis regulatory element. *Human Molecular Genetics* 12(18):2333-2340.
- Owens J, editor. 1994. *Arabs and Arabic in the Lake Chad region*. Köln: Rüdiger Köppe Verlag.
- Paz-Y-Miño C, Burgos G, López-Cortés A, Herrera C, Gaviria A, Tejera E, and Cabrera-Andrade A. 2016. A study of the molecular variants associated with lactase persistence in different Ecuadorian ethnic groups. *Am J Hum Biol*.
- Peakall R, and Smouse PE. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics* 28(19):2537-2539.
- Pedersen J, and Benjaminsen TA. 2008. One leg or two? Food security and pastoralism in the northern Sahel. *Human Ecology* 36(1):43-57.
- Pennings PS, and Hermisson J. 2006. Soft sweeps II--molecular population genetics of adaptation from recurrent mutation or migration. *Mol Biol Evol* 23(5):1076-1084.
- Pereira P. 2014. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition* 30(6):619-627.
- Peške L. 1994. Příspěvek k poznání počátku dojení skotu v pravěku. *Archeologické rozhledy* 46(1):97-104.

- Peters J, von den Dreisch A, and Helmer D. 2005. The upper Euphrates-Tigris basin: cradle of agro-pastoralism? In: Vigne JD, Peters J, and Helmer D, editors. *First Steps of Animal Domestication New archaeozoological approaches*. Oxford: Oxbow Books. p 96-124.
- Pinhasi R, Fort J, and Ammerman AJ. 2005. Tracing the origin and spread of agriculture in Europe. *Plos Biology* 3(12):2220-2228.
- Plantinga TS, Alonso S, Izagirre N, Hervella M, Fregel R, van der Meer JW, Netea MG, and de la Rúa C. 2012. Low prevalence of lactase persistence in Neolithic South-West Europe. *Eur J Hum Genet* 20(7):778-782.
- Poulter M, Hollox E, Harvey CB, Mulcare C, Peuhkuri K, Kajander K, Sarner M, Korpela R, and Swallow DM. 2003. The causal element for the lactase persistence/non-persistence polymorphism is located in a 1 Mb region of linkage disequilibrium in Europeans. *Ann Hum Genet* 67(Pt 4):298-311.
- Priehodová E, Abdelsawy A, Heyer E, and Cerný V. 2014. Lactase persistence variants in arabia and in the african arabs. *Hum Biol* 86(1):7-18.
- Priehodová E, Austerlitz F, Čížková M, Mokhtar MG, Poloni ES, and Černý V. 2017. The historical spread of Arabian Pastoralists to the eastern African Sahel evidenced by the lactase persistence -13,915*G allele and mitochondrial DNA. *American Journal of Human Biology*:e22950-n/a.
- Quasim AA. 1996. *Sudanese encyclopedia of tribes and genealogies*. Khartoum: Maktabat A fi ruqraf.
- Ranciaro A, Campbell MC, Hirbo JB, Ko WY, Froment A, Anagnostou P, Kotze MJ, Ibrahim M, Nyambo T, Omar SA et al. . 2014. Genetic origins of lactase persistence and the spread of pastoralism in Africa. *Am J Hum Genet* 94(4):496-510.
- Rasinperä H, Savilahti E, Enattah NS, Kuokkanen M, Tötterman N, Lindahl H, Järvelä I, and Kolho KL. 2004. A genetic test which can be used to diagnose adult-type hypolactasia in children. *Gut* 53(11):1571-1576.
- Reed FA, and Tishkoff SA. 2006. African human diversity, origins and migrations. *Current Opinion in Genetics & Development* 16(6):597-605.
- Reich CM, and Arnould JP. 2007. Evolution of Pinnipedia lactation strategies: a potential role for alpha-lactalbumin? *Biol Lett* 3(5):546-549.
- Retsö J. 1991. The Domestication of the Camel and the Establishment of the Frankincense Road from South Arabia. 40:187-219.
- Richards MP, Schulting RJ, and Hedges RE. 2003. Archaeology: sharp shift in diet at onset of Neolithic. *Nature* 425(6956):366.
- Richards MP. 2002. A brief review of the archaeological evidence for Palaeolithic and Neolithic subsistence. *Eur J Clin Nutr* 56(12):16 p following 1262.
- Ridl J, Edens CM, and Černý V. 2009. Mitochondrial DNA Structure of Yemeni Population: Regional Differences and the Implications for Different Migratory Contributions. In: Petraglia MD, and Rose JI, editors. *The evolution of human populations in Arabia Paleoenvironments, prehistory and genetics*. New York: Springer. p 69-78.
- Sabeti PC, Reich DE, Higgins JM, Levine HZP, Richter DJ, Schaffner SF, Gabriel SB, Platko JV, Patterson NJ, McDonald GJ et al. . 2002. Detecting recent positive selection in the human genome from haplotype structure. *Nature* 419(6909):832-837.

- Sahi T, Isokoski M, Jussila J, Launiala K, and Pyorala K. 1973. RECESSIVE INHERITANCE OF ADULT-TYPE LACTOSE MALABSORPTION. *Lancet* 2(7833):823-825.
- Sahi T. 1974. The inheritance of selective adult-type lactose malabsorption. *Scand J Gastroenterol Suppl* 30:1-73.
- Salque M, Bogucki PI, Pyzel J, Sobkowiak-Tabaka I, Grygiel R, Szmyt M, and Evershed RP. 2013. Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium BC in northern Europe. *Nature* 493(7433):522-525.
- Savaiano DA, and Levitt MD. 1987. Milk intolerance and microbe-containing dairy foods. *J Dairy Sci* 70(2):397-406.
- Schirru E, Corona V, Usai-Satta P, Scarpa M, Oppia F, Loriga F, Cucca F, De Virgiliis S, Rossino R, Macis MD et al. . 2007. Genetic testing improves the diagnosis of adult type hypolactasia in the Mediterranean population of Sardinia. *European Journal of Clinical Nutrition* 61(10):1220-1225.
- Schnorr SL, Sankaranarayanan K, Lewis CM, and Warinner C. 2016. Insights into human evolution from ancient and contemporary microbiome studies. *Curr Opin Genet Dev* 41:14-26.
- Seignobos C. 2003. Mise en place du peuplement et répartition ethnique. In: Seignobos C, and Iyébi-Mandjek O, editors. *Atlas de la province extreme-nord Cameroun*. Paris: IRD MINREST/INC.
- Sereno PC, Garcea EA, Jousse H, Stojanowski CM, Saliège JF, Maga A, Ide OA, Knudson KJ, Mercuri AM, Stafford TW et al. . 2008. Lakeside cemeteries in the Sahara: 5000 years of holocene population and environmental change. *PLoS One* 3(8):e2995.
- Sherratt A. 1983. The secondary exploitation of animals in the Old World. *World Archaeology* 15(1):90-104.
- Siepel A, and Arbiza L. 2014. Cis-regulatory elements and human evolution. *Current Opinion in Genetics & Development* 29:81-89.
- Silanikove N, Leitner G, and Merin U. 2015. The Interrelationships between Lactose Intolerance and the Modern Dairy Industry: Global Perspectives in Evolutional and Historical Backgrounds. *Nutrients* 7(9):7312-7331.
- Simoons FJ. 1970. Primary adult lactose intolerance and the milking habit: a problem in biologic and cultural interrelations. II. A culture historical hypothesis. *Am J Dig Dis* 15(8):695-710.
- Slatkin M, and Rannala B. 2000. Estimating allele age. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 1:225-249.
- Spodsberg N, Troelsen JT, Carlsson P, Enerback S, Sjostrom H, and Noren O. 1999. Transcriptional regulation of pig lactase-phlorizin hydrolase: Involvement of HNF-1 and FREACs. *Gastroenterology* 116(4):842-854.
- Stephens M, and Scheet P. 2005. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *Am J Hum Genet* 76(3):449-462.
- Stephens M, Smith NJ, and Donnelly P. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68(4):978-989.
- Storch D. 2016. Savana aneb popis jednoho chaosu. In: Pokorný P, editor. *Afrika zevnitř Kontinentem sucha a věčných proměn*. Praha: Academia. p 59-80.

- Suarez FL, Savaiano DA, and Levitt MD. 1995. A comparison of symptoms after the consumption of milk or lactose-hydrolyzed milk by people with self-reported severe lactose intolerance. *N Engl J Med* 333(1):1-4.
- Sůvová Z. 2016. Příznaky Sahary: Vymírání severoafrické fauny. In: Pokorný P, editor. *Afrika zevnitř Kontinentem sucha a věčných proměn*. Praha: Academia. p 163-185.
- Suzuki T, Mochizuki K, and Goda T. 2014. Thyroid and glucocorticoid hormones induce expression of lactase-phlorizin hydrolase gene in CDX-2/HNF-1 α co-transfected IEC-6 cells. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 60(5):321-327.
- Sverrisdóttir O, Timpson A, Toombs J, Lecoeur C, Froguel P, Carretero JM, Arsuaga Ferreras JL, Götherström A, and Thomas MG. 2014. Direct estimates of natural selection in Iberia indicate calcium absorption was not the only driver of lactase persistence in Europe. *Mol Biol Evol* 31(4):975-983.
- Swallow DM, and Troelsen JT. 2016. Escape from epigenetic silencing of lactase expression is triggered by a single-nucleotide change. *Nat Struct Mol Biol* 23(6):505-507.
- Swallow DM. 2003. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annu Rev Genet* 37:197-219.
- Šmídková L. 2016. Laktázová perzistence u tuarežských pastevců: Univerzita Karlova.
- Tag CG, Schiffers MC, Mohnen M, Gressner AM, and Weiskirchen R. 2007. A novel proximal -13914G > A base replacement in the vicinity of the common-13910T/C lactase gene variation results in an atypical LightCycler melting curve in testing with the MutaREAL lactase test. *Clinical Chemistry* 53(1):146-148.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30(12):2725-2729.
- Technelysium. 1996. *Chromas*. South Brisbane: Technelysium DNA Sequencing Software.
- Thesiger W. 1959. *Arabian sands*. New York: Dutton.
- Tishkoff SA, Reed FA, Ranciaro A, Voight BF, Babbitt CC, Silverman JS, Powell K, Mortensen HM, Hirbo JB, Osman M et al. . 2007. Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. *Nat Genet* 39(1):31-40.
- Troelsen JT, Olsen J, Møller J, and Sjöström H. 2003. An upstream polymorphism associated with lactase persistence has increased enhancer activity. *Gastroenterology* 125(6):1686-1694.
- Troelsen JT. 2005. Adult-type hypolactasia and regulation of lactase expression. *Biochim Biophys Acta* 1723(1-3):19-32.
- Uerpmann HP, and Uerpmann M. 2002. The Appearance of the Domestic Camel in South-east Arabia. *The Journal of Oman Studies* 12:235-260.
- Uerpmann H-P, Potts DT, and Uerpmann M. 2009. Holocene (Re-)Occupation of Eastern Arabia. In: Petraglia MD, and Rose JI, editors. *The evolution of human populations in Arabia Paleoenvironments, prehistory and genetics*. New York: Springer. p 205-214.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, and Rozen SG. 2012. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40(15):e115.

- Urashima T, Arita M, Yoshida M, Nakamura T, Arai I, Saito T, Arnould JP, Kovacs KM, and Lydersen C. 2001. Chemical characterisation of the oligosaccharides in hooded seal (*Cystophora cristata*) and Australian fur seal (*Arctocephalus pusillus doriferus*) milk. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 128(2):307-323.
- Vandenplas Y. 2015. Lactose intolerance. *Asia Pac J Clin Nutr* 24 Suppl 1:S9-13.
- Vigne JD, and Helmer D. 2007. Was milk a 'secondary product' in the Old World Neolithisation process? Its role in the domestication of cattle, sheep and goats. *Anthropozoologica* 42(1):9-40.
- Vigne J-D. 2008. Zooarchaeological Aspects of the Neolithic Diet Transition in the Near East and Europe, and Their Putative Relationships with the Neolithic Demographic Transition. In: Bocquet-Appel J-P, and Bar-Yosef O, editors. *The Neolithic Demographic Transition and its Consequences*. Dordrecht: Springer Netherlands. p 179-205.
- Vigne JD. 2011. The origins of animal domestication and husbandry: A major change in the history of humanity and the biosphere. *Comptes Rendus Biologies* 334(3):171-181.
- Voet D, and Voet GJ. 2011. *Biochemistry*: John Wiley & Sons, Inc.
- Vyhledávka 352/2009 Sbirky zákonů ČR.
- Walstra P, Wouters JTM, and Geurts TJ. 2006. *Dairy Science and Tehcnology*, Second Edition. Boca Raton, FL 33487-2742: CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC.
- Wang Y, Harvey CB, Hollox EJ, Phillips AD, Poulter M, Clay P, Walker-Smith JA, and Swallow DM. 1998. The genetically programmed down-regulation of lactase in children. *Gastroenterology* 114(6):1230-1236.
- Wang YX, Harvey CB, Pratt WS, Sams VR, Sarner M, Rossi M, Auricchio S, and Swallow DM. 1995. THE LACTASE PERSISTENCE/NON-PERSISTENCE POLYMORPHISM IS CONTROLLED BY A CIS-ACTING ELEMENT. *Human Molecular Genetics* 4(4):657-662.
- Warinner C, Hendy J, Speller C, Cappellini E, Fischer R, Trachsel C, Arneborg J, Lynnerup N, Craig OE, Swallow DM et al. . 2014. Direct evidence of milk consumption from ancient human dental calculus. *Sci Rep* 4:7104.
- Witas HW, Płoszaj T, Jędrychowska-Dańska K, Witas PJ, Masłowska A, Jerszyńska B, Kozłowski T, and Osipowicz G. 2015. Hunting for the LCT-13910*T allele between the Middle Neolithic and the Middle Ages suggests its absence in dairying LBK people entering the Kuyavia region in the 8th millennium BP. *PLoS One* 10(4):e0122384.
- Wolfram Research I. 2005. *Matematica*. Champaign, Illinois: Wolfram Research, Inc.
- Xiao N, Cai S, Moritz M, Garabed R, and Pomeroy LW. 2015. Spatial and Temporal Characteristics of Pastoral Mobility in the Far North Region, Cameroon: Data Analysis and Modeling. *PLoS One* 10(7):e0131697.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, and Madden TL. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13:134.
- Young WC. 1996. *The Rashaayda Bedouin: Arab Pastoralists of Eastern Sudan*: Harcourt Brace College Publishers.
- Zápotočká M. 2007. *Archeologie pravěkých Čech 3. Neolit*. Praha: Archeologický ústav AV ČR, Praha, v. v. i.

- Zeder MA. 2008. Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, diffusion, and impact. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(33):11597-11604.
- Zeltner JC. 1980. Pages d ' histoire du Kanem, pays tchadien. Paris: l'Harmattan.
- Zeltner JC. 2002. Histoire des Arabes sur les rives du lac Tchad. Paris: Karthala.
- Zittermann A, Bock P, Drummer C, Scheld K, Heer M, and Stehle P. 2000. Lactose does not enhance calcium bioavailability in lactose-tolerant, healthy adults. *Am J Clin Nutr* 71(4):931-936.

Seznam tabulek

Tabulka 1: Obsah živin v mléce vybraných savců v % (Belitz et al. 2009).....	11
Tabulka 2: Obsah vybraných minerálních látek a vitamínů v 1 l plnotučného kravského mléka a jejich doporučená denní dávka (DDD). (Pereira 2014; Walstra et al. 2006; DDD podle Vyhláška 352/2009 Sbírky zákonů ČR)	12
Tabulka 3: Mutace v intronu 13 <i>MCM6</i> spojované s LP.....	21
Tabulka 4: Odhad stáří pro-LP mutací podle různých studií.....	40
Tabulka 5: Přehled použitých populačních souborů.....	54
Tabulka 6: Přehled použitých vzorků určení doby expanze mutace –13915*G.	58
Tabulka 7: Sloučené populační soubory pro určení doby expanze -13915*G.....	58
Tabulka 8: Charakteristiky SNP, jež byly použity pro odhad doby expanze mutace – 13915*G.	59
Tabulka 9: Sekvence primerů, teplota nasedání primerů a velikosti amplifikovaných úseků v okolí šesti SNP použitých pro odhad doby expanze mutace –13915*G.....	60
Tabulka 10: Primery použité k sekvenování kontrol pro HRM.	61
Tabulka 11: Frekvence nalezených mutací ve zkoumaném 359 bp dlouhém úseku intronu 13 genu <i>MCM6</i>	65
Tabulka 12: Intra-populační variabilita pro –13915*G.....	68
Tabulka 13: Intra-populační variabilita pro –13910*T	69
Tabulka 14: Intra-populační variabilita pro –14009*G.....	70
Tabulka 15: Analýza molekulárního rozptylu pro jednotlivé varianty a jejich kombinace	71
Tabulka 16: Variabilita vysvětlená prvními 3 osami PCoA.....	76
Tabulka 17: Intra-populační variabilita pro –13915*G u souborů pro odhad expanze – 13915*G	77
Tabulka 18: Haplotypy sedmi polymorfismů a jejich zastoupení v jednotlivých souborech.....	78
Tabulka 19: Četnost majoritního haplotypu s –13915*G a všech haplotypů s –13915*G	79
Tabulka 20: Odhad doby expanze mutace –13915*G.....	81

Seznam obrázků

Obrázek 1: Laktóza (Voet and Voet 2011).....	13
Obrázek 2: LPH s umístěním dvou enzymatických aktivit (upraveno podle Troelsen 2005).....	14
Obrázek 3: Syntéza LPH a v enterocyty (I, II) a její a její umístění v membráně mikrokliku (III) (Troelsen 2005)	14
Obrázek 4: Metylace enhanceru v genu <i>MCM6</i> a zeslabení exprese genu <i>LCT</i>	19
Obrázek 5: Geny <i>MCM6</i> a <i>LCT</i> (šipkou je znázorněn směr transkripce) a schematické znázornění pozice pro-LP mutací.	19
Obrázek 6: Interpolovaná mapa frekvencí LP fenotypu ve Starém světě.	23
Obrázek 7: Výskyt a zastoupení jednotlivých pro-LP variant ve Starém světě.	24
Obrázek 8 Interpolovaná mapa rozšíření mutace –13915*G na Arabském poloostrově a v přilehlých oblastech (Priehodová et al. 2014)	26
Obrázek 9: Interpolované mapy znázorňující frekvence pro-LP mutací.....	28
Obrázek 10: Výskyt pro-LP mutací u západoafrických Fulbů (názvy černě) a u sousedních usedlých populací (názvy oranžově). FFE – Fulbové Ferlo, FFD – Fulbové Fouta Djallon, FDia –Fulbobé Diafarabe, FBan – Fulbové Banfora, FTin - Fulbové Tindangou, FZR – Fulbové Ziniare, FAde – Fulbové Ader, FAba – Fulbové Abalak, FZin – Fulbové Zinder, FDif – Fulbové Diffa, FBal – Fulbové Balatungur, FLin – Fulbové Linia, FTCh – Fulbové Tchiboua, FBon – Fulbové Bongor, MOS – Mossi, GRS – Gurunsi, GUR – Gourmantche, Koto – Kotoko. Masa – Massa. (Priehodová 2016 – nepublikováno).	29
Obrázek 11: Chronologický rámec šíření zemědělství v rámci Předního východu, Anatólie a Evropy; KYBP – <i>kilo year before present</i> , tisíc let před současností (Balaresque et al. 2010; Pinhasi et al. 2005).	30
Obrázek 12: Znázornění haplotypů v okolí LP alely na základě dat z populace Američanů evropského původu. Černě je znázorněn centrální blok s pozicí C/T-13910, červeně pak haplotypy s –13910*T a fialově haplotypy s -13910*C. Vzdálenosti jsou v centimorganech. Je patrná dlouhá identická oblast v okolí –13910*T (Bersaglieri et al. 2004).	37
Obrázek 13: Haplotypová síť vytvořená na základě analýzy 26 SNP v úseku 3128 bp v rámci intronu 13 genu <i>MCM6</i> . Analyzováno bylo 170 jedinců z 13 populací z celého	

světa. Modře jsou uvedeny pozice mutací, černě čísla haplotypů, červeně pro-LP mutace, žlutě vybarvené kruhy – haplotypy bez pro-LP mutace, zeleně haplotypy s pro-LP mutací. Haplotyp s mutací -13910*T (H98) a haplotyp -13907*G (H100), vychází ze stejného haplotypu bez pro-LP mutace (H84), zatímco -13915*G (H99) má odlišný výchozí haplotyp (H107) (Enattah et al. 2008 – upraveno).	38
Obrázek 14: Místa sběru vzorků a subsistence tamních populací.	55
Obrázek 15: Znázornění polohy šesti SNP, jež byly použity pro odhad doby expanze mutace -13915*G.....	58
Obrázek 16: PCoA pro C/G-13907, C/T -13910, T/G -13915, T/G -14009, G/C -14010. Osa 1 a 2, kolečka – soubory afrických Arabů, čtverečky – soubory jižní Arábie, pro vysvětlení zkratk viz Tabulka 11.....	72
Obrázek 17: PCoA pro C/G-13907, C/T-13910, T/G-13915, T/G-14009, G/C-14010. Osa 1 a 3, kolečka – soubory afrických Arabů, čtverečky – soubory jižní Arábie, pro vysvětlení zkratk viz Tabulka 11.	73
Obrázek 18: PCoA pro T/G -13915. Osa 1 a 2, kolečka – soubory afrických Arabů, čtverečky – soubory jižní Arábie, pro vysvětlení zkratk viz Tabulka 11.	74
Obrázek 19: PCoA pro C/T-13910. Osa 1 a 2, kolečka – soubory afrických Arabů, čtverečky – soubory jižní Arábie. Pro vysvětlení zkratk viz Tabulka 11.....	75
Obrázek 20: PCoA pro T/G-14009. Osa 1 a 2, kolečka – soubory afrických Arabů, čtverečky – soubory jižní Arábie, pro vysvětlení zkratk viz Tabulka 11.	75
Obrázek 21: Frekvence mutace -13915*G u populací Arabského poloostrova a u afrických Arabů.	83
Obrázek 22: Výskyt pro-LP mutací a subsistence u 13 zkoumaných souborů jižní Arábie a afrických Arabů. Osa x zkratka souboru a subsistence, osa y frekvence pro-LP mutací.	85
Obrázek 23: Podíl osob s -13915*G a západo-eurasijských haplotypů u souborů afrických Arabů a souborů z Jemenu (Priehodová et al. 2017).....	86
Obrázek 24: Mapa výskytu pro-LP mutací u třinácti populací analyzovaných v této studii.	89
Obrázek 25: Odhad doby expanze -13915*G u populací jižní Arábie a u afrických Arabů.....	92

Přílohy

P1 Protokol odběru bukálního stěru a izolace DNA z bukálních stěrů přes kolonky QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)

Odběr bukálního stěru

Na 1 vzorek: 1 sterilní 1,5ml zkumavka; kartáček určený pro bukální stěry s oddělitelnou hlavicí; 1 ml lyzačního roztoku (1,71 g sacharózy, 0,58 g NaCl; 1 g SDS – lauryl sulfát; 10 ml 0,5M TRIS pH 8; 10 ml 0,5M EDTA – doplnit vodou do 100 ml)

1. Odběr se provádí 30 min, nejlépe 60 min po jídle a pití (povolená je pouze voda, nežádoucí jsou kofeinové nápoje a kouření)
2. Odběr DNA – minimálně 30 s stírat kartáčkem pro bukální stěry sliznice vnitřní strany tváří (ne jazyka), vyvarovat se krvácení. Oddělenou hlavicí kartáčku ponořit do 1 ml lyzačního roztoku v 1,5ml zkumavce – uchovávat při -20°C .

Izolace DNA

Na 1 vzorek: 2 sterilní zkumavky 1,5 ml; 1 kolonka s membránou, jež je součástí QIAquick PCR Purification Kitu (Qiagen); PB, PE a EB pufry, jež jsou součástí QIAquick PCR Purification Kitu (Qiagen).

1. Rozmraženou zkumavku s hlavicí kartáčku vortexovat 1 min
2. Odsát 200 μl a přenést do sterilní 1,5ml zkumavky
3. Přidat 1 000 μl extrakčního pufru PB a zvortexovat
4. Inkubovat ve vzdušném inkubátoru při 60°C 1 hod s mícháním (200 otáček) a stočit (1 min/12 000 g).
5. Supernatant přenést ve dvou dávkách do kolonky (po 600 μl), a stočit (1,5 min/12 000 g), po stočení vyndat opatrně membránu a kolonku vylít do výlevky, membránu vrátit.
6. Přidat 200 μl extrakčního pufru PB a stočit (1,5 min/12 000 g), po stočení vyndat opatrně membránu a kolonku vylít do výlevky, membránu vrátit.
7. Přidat 700 μl proplachovacího pufru PE a stočit (1,5 min/12 000 g), po stočení vyndat opatrně membránu a kolonku vylít do výlevky, membránu vrátit.

8. Stočit (3 min/12 000 g), po stočení vyndat opatrně membránu a kolonku vylít do výlevky, membránu přendat do nové sterilní 1,5ml zkumavky nechat otevřené v boxu 15 min aby se všechny zbytky etanolu odpařily.
9. Do středu membrány opatrně nalít 40 μ l EB pufru zahřátého na 37 °C, nechat inkubovat při pokojové teplotě 5 minut a stočit (1,5 min/12 000 g)¹
10. Vyhodit membránu a zkumavku s vyizolovanou DNA uchovávat při –20 °C.

¹ U problematických vzorků je možné pro zvýšení výtěžku tento krok zopakovat, avšak znovu propláchnout stočeným EB pufrům s DNA ve zkumavce.

P2 Readme

Frederic Austerlitz
Laboratoire d'Eco-anthropologie et Ethnobiologie
UMR 7206 CNRS/MNHN/Universite Paris 7
Equipe "Genetique des Populations Humaines"
Museum National d'Histoire Naturelle
CP 139, 57 rue Cuvier
F-75231 Paris Cedex 05,
France. Email: austerlitz@mnhn.fr

The two Mathematica notebooks provided here perform the joint estimation of the growth rate (r) and the age of the mutation (g) from allelic association using either the standard Luria-Delbrück method or the multipoint Luria-Delbrück estimation (Austerlitz et al., 2003). It is always advised to start first with the standard method. The notebooks work properly with Mathematica 5.2. I cannot certify that they will work with other versions of the Mathematica program. For any help, please email me at the above address.

1) Standard Luria-Delbrück method

Notebook: `joint_estim_standard.nb`

This method takes as an input the estimated size of the current population N_0 , the carrier frequency (p), the recombination rate (θ), the number of carriers of the major haplotype (l) and the total number of haplotypes (n) (see Table 1 in Austerlitz et al., 2003). Just submit the first cell and then enter the values that correspond to your case in the function `estim`, and submit this cell.

Note that if your recombination rate is expressed in cM, you have to divide it by 100.

The provided example corresponds to PLOSL (Pekkarinen et al., 1998), with the following parameters: $N_0 = 5,000,000$, $p = 0.002$, $\theta = 0.00217$, $n = 18$, $l = 24$ (see Table 1 in Austerlitz et al., 2003).

The obtained results are $r = 1.03$ (95% CI 1.02, 1.05), $g = 198.8$ generations (95% CI 152.0, 275.4).

Note that you may have to modify the starting values in the `FindMinimum` function so that it works properly in your case.

Note also that the program should display some warnings corresponding mostly to variables with close names, but this does not prevent the estimation from running.

2) Multipoint Luria-Delbrück method Notebook: `jont_estim_multipoint.nb`

Important: Note that for this method, if you have two markers (or more) that are completely linked to each other (no recombinant between them), you need to remove the data concerning the markers that are the closest from your mutation.

Here you need first to submit the first cell.

Then you need to enter the following parameters (the provided example is again for PLOSL, Pekkarinen et al, 1998).

npop = population size (N_0)

fport = carrier frequency (p)

θ_{lmax} = number of markers on the left side of the disease locus.

θ_{rmax} = number of markers on the right side of the disease locus.

$\theta_l[i]$, $1 \leq i \leq \theta_{lmax}$ = the recombination rate between marker # i on the left side and the mutation locus.

$\theta_r[i]$, $1 \leq i \leq \theta_{rmax}$ = the recombination rate between marker # i on the right side and the mutation locus.

Note that if your recombination rates are expressed in cM, you have to divide them by 100. In the provided example, these values were computed from the values given at the bottom of page 309 in Pekkarinen et al (1998). Note that here you must enter the recombination rate between each marker and the mutation locus, and not the recombination rates between adjacent markers.

Then you need to enter the numbers $n[i][j]$ of haplotypes that have i markers on the left side and j markers on the right side in common with the most frequent haplotype. In the example, these numbers are deduced from Table 4 in Pekkarinen et al (1998).

Then you should modify the starting values in the FindMinimum function below, putting values close to the estimates obtained with the standard method. After entering this, you can run all cells.

The obtained results for the example are $r = 1.03$ (95% CI 1.02, 1.05), $g = 203.4$ generations (95% CI 158.2, 277.3).

References

Austerlitz, F., Kalaydjieva, L. & Heyer, E. 2003. Detecting population growth, selection and inherited fertility from haplotypic data. *Genetics* **165**: 1579-1586.

Pekkarinen, P., Kestila, M., Paloneva, J., Terwilliger, J., Varilo, T., Järvi, O., Hakola, P. & Peltonen, L. 1998. Fine-scale mapping of a novel dementia gene, PLOSL, by linkage disequilibrium. *Genomics* **54**: 307-315.

P3 Populace pro obrázek 21

Lokalita	Populace	Subsistence	n	-13915*G	Citace
Kamerun	Arabové Baggara	pastevci	31	0,032	Ranciaro et al 2014
Kamerun	Arabové Šuwa	pastevci	16	0,063	Ingram et al. 2007
Nigérie	Arabové Šuwa	smíšené zemědělci	52	0,067	současná studie
Čad	Arabové Abbala	pastevci	51	0,255	současná studie
Čad	Arabové Baggara	pastevci	27	0,444	současná studie
Súdán	Arabové Shwaiga	usedlí zemědělci	38	0,236	Hassan et al. 2016
Súdán	Arabové Gaalien	usedlí zemědělci	40	0,225	Hassan et al. 2016
Súdán	Arabové Shokrya	pastevci	40	0,450	Hassan et al. 2016
Súdán	Arabové Džálin	usedlí zemědělci	88	0,142	Ingram et al. 2007
Súdán	Arabové Rašajda	pastevci	52	0,760	současná studie
Súdán	Arabové Baggara	pastevci	53	0,198	současná studie
Súdán	Arabové	usedlí zemědělci	46	0,087	současná studie
Egypt el Hayz	Egyptané	usedlí zemědělci	35	0,014	současná studie
Izrael	Arabové	usedlí zemědělci	81	0,049	Ingram et al. 2007
Izrael	beduíni	pastevci	19	0,132	Ingram et al. 2007
Jordánsko	beduíni	pastevci	23	0,391	Ingram et al. 2007
Sýrie, Írák, Libanon, Palestina	Arabové	neuveďeno	40	0,054	Enattah et al. 2008
Saudská Arábie	Arabové	neuveďeno	248	0,57	Enattah et al. 2008
Saudská Arábie	beduíni	pastevci	46	0,498	Ingram et al. 2007
Saudská Arábie – střed	Arabové	neuveďeno	90	0,600	Imtiaz et al. 2007
Saudská Arábie – východ	Arabové	neuveďeno	82	0,616	Imtiaz et al. 2007
Saudská Arábie – sever	Arabové	neuveďeno	82	0,520	Imtiaz et al. 2007
Saudská Arábie – jih	Arabové	neuveďeno	92	0,580	Imtiaz et al. 2007
Saudská Arábie – západ	Arabové	neuveďeno	86	0,650	Imtiaz et al. 2007
Jemen Saná	Jemenci	neuveďeno	239	0,548	Al-Abri et al. 2012
Jemen Al-Achkum	Jemenci	usedlí zemědělci	43	0,651	současná studie
Jemen Hudajda	Jemenci	usedlí zemědělci	67	0,590	současná studie
Jemen Hadždža	Jemenci	usedlí zemědělci	35	0,614	současná studie
Jemen Sokotra	Jemenci	usedlí zemědělci	65	0,569	současná studie
Jemen Hadramawt	Jemenci	usedlí zemědělci	40	0,250	současná studie
Omán Zufár	Ománci	usedlí zemědělci	54	0,657	současná studie
Omán Zufár	Ománci	neuveďeno	210	0,724	Al-Abri et al. 2012
Omán – sever	Arabové	neuveďeno	342	0,136	Al-Abri et al. 2012

-13915*G – frekvence -13915*G, n – velikost souboru, citace – viz *Použitá literatura*