Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Antropologie a genetika člověka

Bc. Izabela Toman

Stanovení mutačního spektra a frekvenčního zastoupení variant u genů zapojených v signalizační kaskádě melanokortinového receptoru 4. typu (MC4R)

Determination of mutation spectrum and frequency representation of variants in genes involved in Melanocortin Receptor Type 4 Signaling Cascade (MC4R)

Diplomová práce

Vedoucí práce:

Mgr. Josef Včelák

Praha, 2022

Prohlášení

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

V Praze, 25.04.2022

……..……

Bc. Izabela Toman

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Mgr. Josefu Včelákovi za cenné rady, připomínky a bezbřehou trpělivost při vypracovávání této diplomové práce. Chtěla bych také poděkovat kolektivu z oddělení obezitologie a oddělení molekulární endokrinologie Endokrinologického ústavu, že jsem mohla pro tuto práci využít vzorky z DNA banky, kterou vytvořili v předchozích výzkumných projektech. Mé díky také patří mým rodičům za podporu během celého studia a mému příteli, který mi poskytl mnoho připomínek k jazykové stránce textu.

Abstrakt

Tato diplomová práce je zaměřená na stanovení mutačního spektra a frekvenčního zastoupení variant u genů zapojených v signalizační kaskádě melanokortinového receptoru 4. typu. Mutace v genech signalizační kaskády MC4R mohou způsobovat takzvaný monogenní typ obezity, který je kromě mutace v jednom genu charakterizován obezitou s časným nástupem a hyperfagii. Vzhledem k novým možnostem léčby je důležité zjistit, jaká je frekvence výskytu mutací u české dětské a adolescentní populace.

Teoretická část práce je věnovaná popisu energetické homeostáze a leptin-melanokortinové dráhy. Do práce je také zahrnuta fyziologie hladu a sytosti, jakož i nejčastější příčiny a geny způsobující monogenní obezitu. Zmíněny jsou také populační rozdíly v genetických predispozicích u monogenní obezity, a to u genů *MC4R, POMC, SIM1* a *BDNF,* které byly cílem této práce.

V praktické části byla provedena genetická analýza 1910 vzorků české adolescentní a dětské populace. Pomocí sekvenování nové generace bylo identifikováno 12 různých, pravděpodobně kauzálních, variant. Přesněji 8 různých mutací *MC4R*, 2 mutace *POMC* a 2 mutace *SIM1*. Jedná se i o dvě doposud nepopsané varianty c.346 C> T (Gln116Ter) v genu *POMC* a c.460C> G (Arg154Gly) v genu *SIM1*.

Molekulárně genetické testování obézních dětí a adolescentů může výrazně přispět k pochopení mechanismu vzniku monogenní i polygenní obezity, jakožto i k nalezení nových, potencionálně patogenních, variant. Práce napomohla v mapování populačního výskytu v české populaci.

Klíčová slova

Obezita, Monogenní obezita, *MC4R, POMC, SIM1, BDNF,*

Abstract

This master´s thesis is focused on determination of mutation spectrum and frequency representation of variants in genes involved in Melanocortin Receptor Type 4 Signaling Cascade. Mutation in genes connected to MC4R signalisation cascade may induce so called monogenic type of obesity, which is characterised not only by mutation in single gene but also by an early onset severe obesity and hyperphagia. Due to new means of medications being introduced its especially important to ascertain the frequency of mutations in Czech children and adolescent population.

Theoretic part of the thesis is devoted to description of energy homestasis and leptin-melanocortin pathway. Physiology of hunger and satiety and the most common causes of obesity and monogenic obesity are also included. There is also mention of population differences in genetical predisposition for monogenic obesity namely in genes *MC4R, POMC, SIM1* and *BDNF* which were the focal points of this thesis.

In practical part, genetical analysis of 1910 samples from Czech children and adolescent population was implemented. We identified twelve different, likely pathogenic causal variants via next generation sequencing. More precisely eight different MC4R variants, 2 POMC variants and 2 SIM1 variants. In those, two novel variants were found c.346 C> T (Gln116Ter) in *POMC* gene and c.460C> G (Arg154Gly) *SIM1* gene.

Molecular-genetic testing of obese children and adolescents may significantly improve the insight in mechanism of origin for monogenic and polygenic obesity as well as finding new potentially pathogenic variants. This thesis helped with mapping of population incidence in czech population.

Keywords

Obesity, Monogenic obesity, *MC4R, POMC, SIM1, BDNF,*

Obsah

1. ÚVOD 11

1.1. Obezita 12

1.2. Zdravotní dopady obezity 12

1.3. Role socioekonomického statusu 13

1.4. Leptin-melanokortinová dráha 13

1.5. Leptin 14

1.6. Hypothalamická jádra 15

1.7. Nucleus arcuatus – anatomické umístění 15

1.8. Anorexigenní signály 16

1.9. Orexigenní signály 16

1.10. MC4R kaskáda 17

1.11. Proopiomelanokortin 18

1.12. Melanokortiny 19

1.13. Receptory 20
1.13.1. MC1R 20
1.13.2. MC2R a ACTH receptory 20
1.13.3. MC3R 20
1.13.4. MC4R 21
1.13.5. MC5R 21

2. FYZIOLOGIE SYTOSTI A HLADU 22

2.1. Krátkodobá regulace příjmu potravy a energetické homeostáze 22

2.2. Dlouhodobá regulace příjmu potravy a energetické homeostaze 22

2.3. Regulační peptidy 22
2.3.1. Cholecystokinin 23
2.3.2. Ghrelin 23
2.3.3. Glukagonu podobný peptid 1 23
2.3.4. Amylin 24

3. NEJČASTĚJŠÍ PŘÍČINY OBEZITY 25

3.1. Polygenní obezita 25

3.2. Syndromová obezita 25

3.3. Monogenní obezita 26

4. VYBRANÉ GENY ZPŮSOBUJÍCÍ MONOGENNÍ OBEZITU 27

4.1. *LEP* – leptinový gen 27

4.2. *LEPR* – gen pro leptinový receptor 27

4.3. *POMC* – gen pro proopiomelanokortin 27

4.4. *MC4R* – gen pro melanokortinovy receptor 4 28

4.5. *SIM1* – gen pro single minded homolog 1 29

4.6. *PCSK1* – gen pro proprotein konvertázu subtilisin/kexin 1 typu 29

4.1. *BDNF/NTKR2* – gen pro z mozku odvozený neurotrofický faktor a jeho receptor 29

5. MOŽNOSTI LÉČBY 30

5.1. Liraglutide 30

5.2. Methylphenidate (MPH) 31

5.3. Setmelanotid 33

6. POPULAČNÍ ROZDÍLY V GENETICKÝCH PREDISPOZICÍCH MONOGENNÍ OBEZITY 34

***6.1. MC4R* 35**

***6.2. POMC* 37**

6.3. SIM1 37

6.4. BDNF 37

7. CÍL PRÁCE 39

8. MATERIÁL A METODY 40

8.1. Materiál 40

8.2. Použité reagencie 44
8.2.1. Roztoky 45
8.2.2. Primery 45

8.3. Metody 45
8.3.1. Izolace DNA 45
8.3.2. Fluorimetrické měření koncentrace DNA 46
8.3.3. Příprava NGS knihoven 47
8.3.4. Čištění NGS knihoven 49
8.3.5. Přidání adaptorů pro sekvenaci do pročištěné knihovny 50
8.3.6. Zjištění kvality a koncentrace připravených NGS knihoven 50
8.3.7. Sekvenace 52
8.3.8. Analýza sekvencí 53
8.3.9. Hodnocení variant 54
8.3.10. Predikční algoritmy 54

9. VÝSLEDKY 56

10. DISKUSE 63

11. ZÁVĚR 73

12. SEZNAM ZKRATEK 74

13. CITACE 76

14. PŘÍLOHY 91

14.1. Primery použité k NGS 91

1. Úvod

V posledních letech dochází v globálním měřítku k nárustu prevalence obezity, a to bez ohledu na pohlaví, rasu, socioekonomickou skupinu či etnickou příslušnost, čímž se jí dostává pandemických rozměrů. Hodnoty body mass indexu (BMI) ≥ 30 kg/m^2, jenž definuje obezitu, dosahuje celosvětově jeden z osmi lidí. Hodnotu BMI ≥ 35 kg/m^2 s nejméně jednou komorbiditou spojenou s obezitou, nebo BMI ≥ 40 kg/m^2, je možno pozorovat u 2 až 6 % celosvětové populace.

Mezi nejvzácnější, ale také nejzávažnější, typy obezity patří monogenní obezita, která se projevuje již ve velmi časném věku a pacientům způsobuje závažné zdravotní i psychické obtíže celý jejich život. Je důležité zmínit, že klasické přístupy léčby obezity, jako jsou restriktivní diety nebo bariatrické operace, mají na tento typ obezity minimální účinek.

Nicméně s vývojem vědy a medicíny se objevují nová a účinná farmaka, a je proto důležité zjistit, s jakou frekvencí se v české populaci adolescentů objevují mutace v genech, které jsou zapojeny do energetické homeostáze.

1.1. Obezita

Dle recentních údajů téměř 56 % české populace dosahuje hmotnosti převyšující normu, z čehož 17 % trpí obezitou (Puklová, 2018).

WHO obezitu definuje jako abnormální nebo nadbytečnou akumulaci tukové tkáně, která představuje zdravotní riziko (WHO, 2022).

1.2. Zdravotní dopady obezity

Vliv obezity na zdraví člověka je velice dobře znám. Obezita výrazně zvyšuje riziko metabolických nemocí (diabetes mellitus 2. typu či nealkoholová tuková choroba jater neboli NAFLD), kardiovaskulárních onemocnění (infarkt myokardu, hypertenze), muskuloskeletálních onemocnění (ostheoartritis), Alzheimerovy choroby, deprese či některých typů rakoviny. Kromě zdravotních obtíží může obezita přispívat ke snižování kvality života, nezaměstnanosti, snížené pracovní produktivitě a především ke zkracování života jedince (Blüher, 2019). Mezi další rizikové faktory patří rozložení tukové tkáně; zvláště riziková je abdominální obezita, která není závislá na celkovém BMI, nýbrž je definována obvodem pasu a to hodnotami nad 102 cm u mužů a nad 88 cm u žen (Kim et al., 2019).

Obezita je komplexní chorobou, která je ovlivňována nejen faktory enviromentálními, ale i genetickými, které poté společně přispívají k dysbalanci mezi příjmem a výdejem energie, a vedou k nadměrnému množství tukové tkáně. Jako enviromentální vlivy můžeme zmínit nadměrný příjem kalorii a/nebo nedostatek pohybu. S pokrokem v molekulární biologii a genetice, především pak v genetickém sekvenování, bylo objeveno mnoho genů, které obezitu mohou ovlivňovat nebo ji přímo způsobují.

1.3. Role socioekonomického statusu

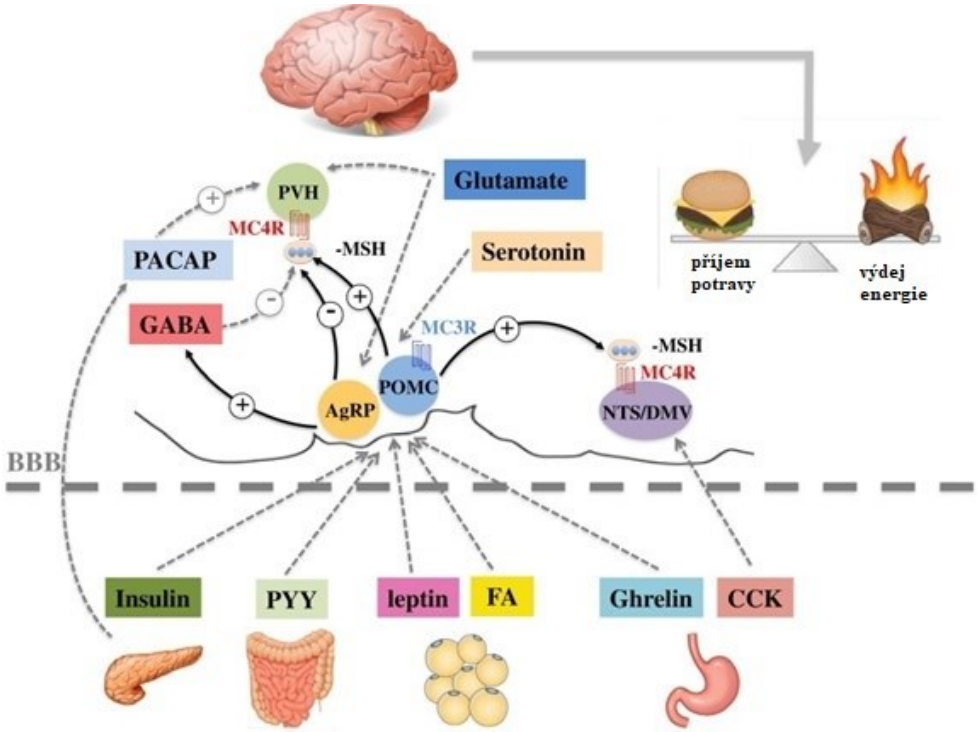
Vzestup prevalence obezity byl zaznamenán nejdříve ve vysoce příjmových zemích v 70. letech 20 století; následně se začala zvyšovat prevalence ve středně příjmových a nízkopříjmových zemích. Všechna tato data naznačují, že se míra obezity shoduje, resp. roste, se zlepšující se ekonomickou situací obyvatelstva. Obrovská heterogenita v prevalenci obezity mezi zeměmi nicméně neodráží pouze ekonomické, ale i etnické a jiné rozdíly (Blüher, 2019).

1.4. Leptin-melanokortinová dráha

Současné studie naznačují, že centrální nervová soustava hraje klíčovou úlohu v rozvoji i prevenci obezity. Leptin-melanokortinová osa je jednou z nejdůležitějších prvků regulace energetické homeostáze. Funguje rovněž jako křižovatka signálu z periferních orgánů a celkové dietární situace. I malá odchylka v této ose může mít potenciálně závažné důsledky, a proto je nutná precizní kontrola a koordinace energetické homeostáze.

Leptin-melanokortinová dráha byla objevena již v roce 1961, a to konkrétně její zapojení do regulace pigmentace kůže. Klíčový objev pro roli této dráhy v energetické homeostázi přišel až v roce 1997, kdy byly naklonovány melanokortinové receptory 3 a 4 (MC3R a MC4R) (Haskell-Luevano, 2006).

Cirkulující leptin se dostává hematoencefalickou membránou do hypothalamu a váže se na dlouhou isoformu leptinového receptoru. To spouští následující kaskádu událostí. Leptin se váže na svoje receptory na neuronech hypothalamu, které co-exprimují Neuropeptid Y(NPY) a aguti podobný protein (AgRP) viz obrázek 1.; právě vazbou jsou tyto orexigenní proteiny inhibovány. Navázání leptinu také stimuluje expresi anorexigenniho proopiomelanokortinu (POMC) a kokainem a amfetaminem regulovaného tranksriptu (CART) (Beckers et al., 2009).



Obrázek 1.: Leptin-melanokortinová dráha (Shen et al., 2017). PACAP: hypofýzový adenylat cyklaza-aktivující peptid, FA: Mastné kyseliny, PYY: peptid YY, CCK: cholecystokinin, BBB:hematoencefalická bariéra,NTS/DMV: nukleus tractus solitarius/ dorsální motorický nukleus n. vagus, PVH nukleus paraventrikularis,

1.5. Leptin

Objev leptinu v roce 1994 přinesl první přímý důkaz o hormonálním systému regulujícím tělesnou hmotnost. Mutace v *ob* genu u myší (gen kódující hormon leptin) vyvolalo úplnou absenci leptinu a způsobilo časně nastupující morbidní obezitu; *ob/ob* myši mají také hyperglykémii, hypothyroidismus, dyslipidemii, defektivní T-buňkami zprostředkovanou imunitu a jsou neplodné (Moon et al., 1997). Relevance téhož genu u lidí byla potvrzena v roce 1997, kdy byla poprvé popsána vrozená deficience leptinu způsobující časně nastupující morbidní obezitu s hyperfagii (Oswal et al., 2007).

Leptin je cytokinin I. typu a je převážně sekretován bílou tukovou tkání, jmenovitě diferencovanými adipocyty, aby signalizoval energetický stav těla. Uplatňuje se především jako signál sytosti v hypothalamu. Poté co se leptin naváže na svůj receptor aktivuje janus kinázu (JAK2), která poté fosforyluje tři tyrozinové zbytky v leptinovem receptoru, což indukuje fosforylaci STAT transkripčních faktorů STAT5 a STAT3. Tato aktivační dráha zprostředkovává metabolickou vazbu mezi hladinou leptinu a homeostatickými dráhami, které zahrnují růst, glykemickou kontrolu i výdej kalorií (Allison et al., 2014; Baldini et al., 2019).

1.6. Hypothalamická jádra

Kontrolní mechanismus se nachází v předním mozku, a to především v nukleus arcuatus (ARC) na spodině hypothalamu. Další oblasti zahrnují nucleus ventromedialis (VMH), nucleus dorsomedialis (DMH) a nukleus lateralis (LH) hypothalamu; všechny uvedené jsou umístěny v blízkosti třetí mozkové komory viz obrázek 2. Můžeme tam lokalizovat i dvě hypothalamická centra, centrum sytosti ve ventromediálním hypothalamu a centrum potravové v laterálním hypothalamu (Timper et al., 2017).

1.7. Nucleus arcuatus – anatomické umístění

Nucleus Arcuatus je soubor neuronů v mediobazálním hypothalamu na spodině třetí mozkové komory v blízkosti eminentia mediana, které kvůli svému strategickému umístění není pokryto hematoencefalicou barierou, což umožnuje vychytávat z krve signály sytosti nebo hladu.

ARC se skládá z dvou populací neuronů, které mají zásadní roli v modulaci příjmu potravy, a to (i) anorexigenních neuronů proopiomelanokortinu (POMC) a s kokainem a amfetaminem spřízněný transkript (CART), a (ii) orexigenní společně exprimované neurony Agrouti spřízněného proteinu (Agrp) a neuropeptidu Y (NPY) (Yousefvand et al., 2020).

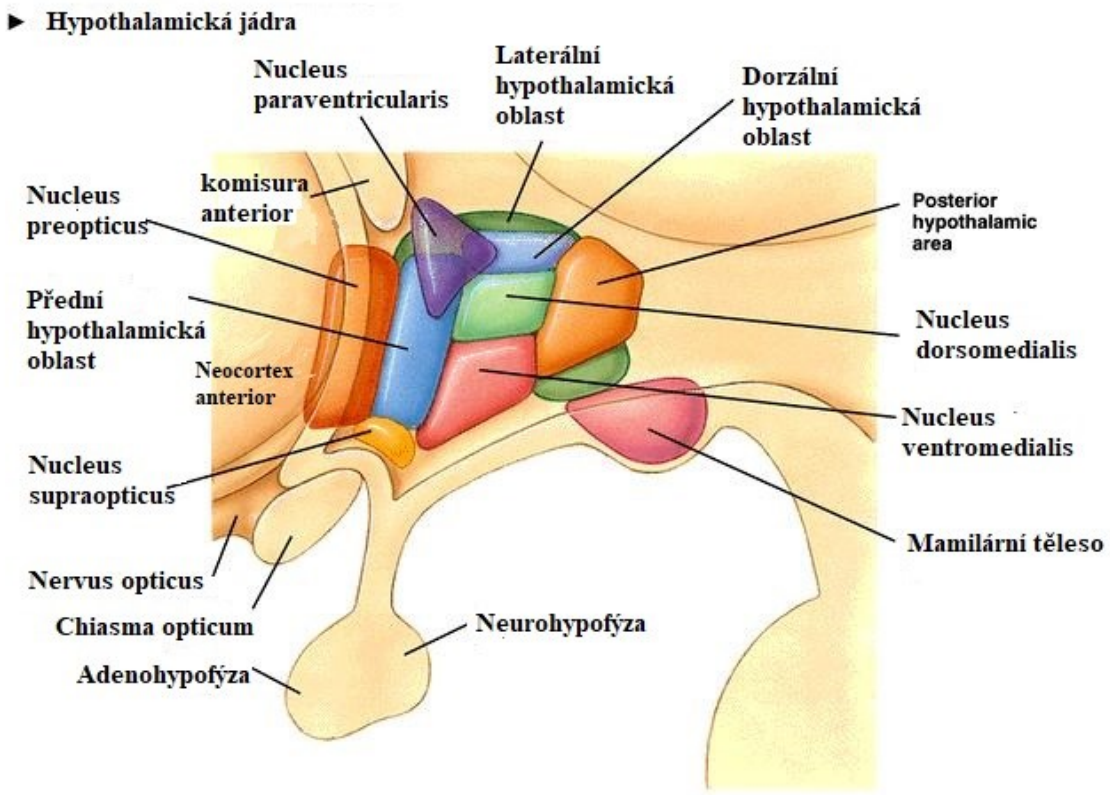
1.8. Anorexigenní signály

Anorexigenni funkce POMC pracuje na principu signalizace pomocí α-MSH, které se společně s CART naváže na MC4R receptory, což dá signál centru sytosti, kde poté dochází k navození pocitu sytosti, zvýšení energetického výdeje a zároveň i ke snížení energetického příjmu (Sobrino Crespo et al., 2014).

1.9. Orexigenní signály

AgRP a NPY jsou druhou populací neuronů v nucleus arcuatus, kde oba fungují jako neurotransmitní antagonisté POMC, snižující nebo potlačující funkci MC3R a MC4R a působící proti α-MSH. Takto fungují jako signály orexigenní, neboli signály hladu. Fungují na principu navázání se NPY a AgRp na Y1 receptor (Loh et al., 2018) a následné signalizace do centra hladu, ve kterém dojde k navození pocitu hladu, snížení energetického výdeje a zvýšení energetického příjmu. Hormony jako ghrelin či nízké hladiny leptinu a inzulínu jsou primární signály hladu a způsobují excitaci neuronů, AgRP /NPY.

Orexigenní i anorexigenni ARC neurony se promítají do druhých neuronů v PVN (nukleus paraventricularis), VMH, DMH a LH jádrech, které zpracovávají informace týkající se energického a metabolického stavu; dále se signál promítá do dorsálního vagálního komplexu, který zahrnuje nukleus tractus solitarius a dorzální motorické nucleii nervus vagus.



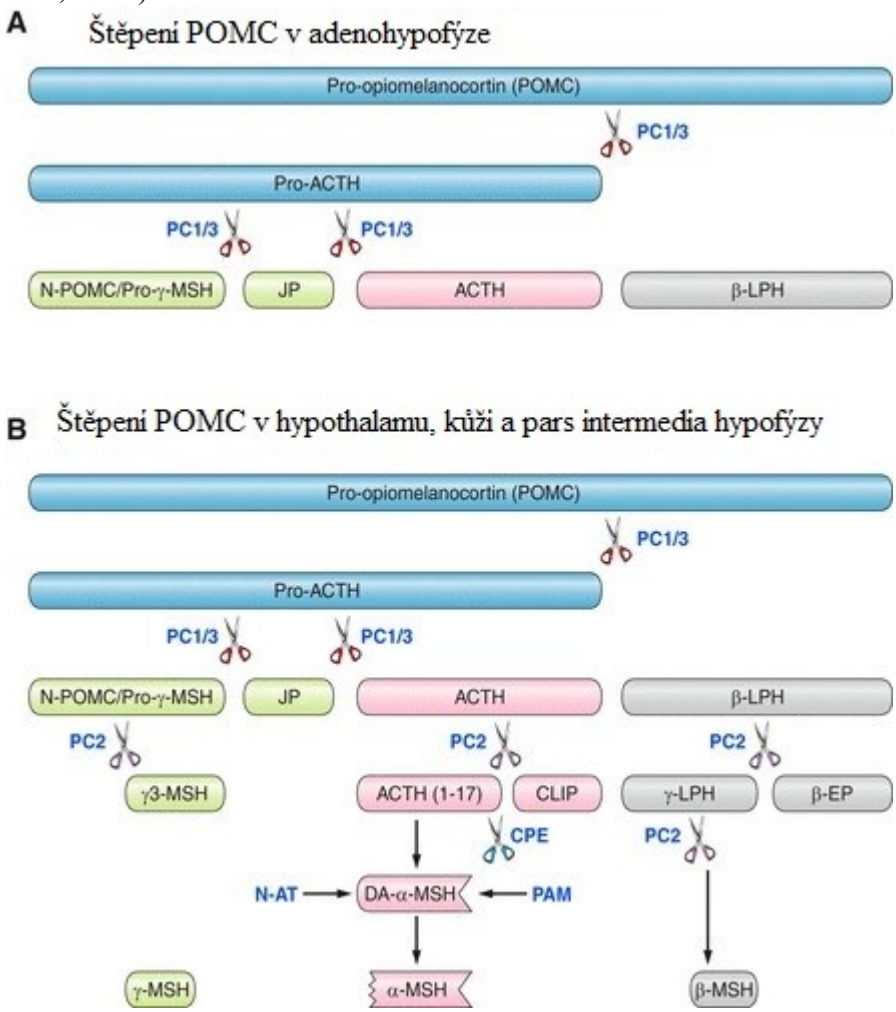
Obrázek 2: Schéma hypothalamických jader. Upraveno dle (Luxy, 2019)

1.10. MC4R kaskáda

Melanocortinový systém se v nejznámější podobě skládá z agonistů, dvou antagonistů a pěti receptoru. Mezi agonisty řadíme α-MSH β-MSH γ-MSH a ACTH; všechno jsou to tkáňově specifické posttranslační produkty pre-hormonu proopiomelanokortinu (POMC).

1.11. Proopiomelanokortin

POMC je polypeptidový hormonální prekursor procházející tkáňově specifickými post translačními úpravami, který především poskytuje biologicky aktivní peptidy jako melanocyt-stimulující hormony α, β, a γ, také opioidní receptorový ligand β–endorphin a ACTH viz obrázek 3. Právě tkáňová specificita je příčinou širokého spektra produktů, které jsou schopny kontrolovat různé fyziologické funkce stejným prohormonem (Harno et al., 2018). Exprese leptinového receptoru v neuronech POMC byla identifikována krátce po úspěšném klonování ObR, což nasvědčovalo, že melanokortinová signalizace je „downstream“ od adipostatické signalizace leptinu (Baldini et al., 2019).



Obrázek 3.: Schéma štěpení POMC. (A)V adenohypofýze pro-hormon konvertáza 1/3(PC1/3) štěpí POMC na pro-ACTH dále na adrenokotikotropni hormon (ACTH), β-lipotropní hormon (β-LPH), NH2-terminalní peptid (N-POMC) a spojovací peptid (JP). (B) V hypothalamu, kůži a pars intermedia je ACTH dále štěpen pro-konvertázou 2 na adrenokotikotropni hormon (ACTH) a kortikotropinu podobný peptidový meziprodukt (CLIP). Karboxypeptidaza E (CPE) následně štěpí bazické aminokyselinové zbytky z COOH konce, co umožňuje amidaci peptidyl-glycinem α-amidační monooxygenaza (PAM) aby vytvořila des-acetyl α-MSH (DA-α-MSH. N-acetyltransferaza (N-AT) konečně acetyluje DA-α-MSH a vytvoří α-MSH.(β-EP) β-endorphin. Upraveno dle (Harno et al., 2018).

1.12. Melanokortiny

Melanokortiny obsahují společnou sekvenci His-Phe-Arg-Trp, která je klíčovou strukturou (farmakofor) pro biologickou aktivitu viz obrázek 4. (Ericson et al., 2017). V adenohypofýze je POMC zpracováno na ACTH a jiné peptidy prohormon konvertázou 1 (PC1). V kůži a vlasových folikulech je POMC zpracováván prohormon konvertázou 2 (PC2) na melanokortin stimulujici hormon (MSH). Jedním z unikátu melanokortinové dráhy je přítomnost endogenních antagonistů AgRP, jelikož žádní další endogenní antagonisté nebyli ve spojení s g-protein spřaženými receptory nalezeni.

Obrázek 4.: Červeně vyznačený opakující se farmakofor u melanokotinů. Upraveno dle (Ericson et al., 2017)

1.13. Receptory

Pět melanokortinových receptorů zprostředkovává různorodou činnost melanokortinu. Tyto receptory jsou číslovány od MC1R po MC5R, a to dle pořadí jejich klonování. Všechny receptory obsahují společnou 7 α-helikální transmembránovou doménu, extracelulární N konec, intracelulární C konec a jsou spojené třemi extra a intra celulárními smyčkami viz obrázek 5.

1.13.1. MC1R

Je to klasický MSH receptor, exprimovaný ve vlasových folikulech a melanocytech v kůži, který reguluje pigmentaci. Zajímavostí je, že MC1R je exprimován leukocyty, kde zprostředkovává imunomodulační a protizánětlivé vlastnosti melanokortinů.

1.13.2. MC2R a ACTH receptory

Jsou exprimovaný v kůře nadledvin v zona retikularis i zona fasciculata, kde regulují tvorbu steroidů (steroidogenezi) a proliferaci buněk. Receptor MC2R se liší od jiných melanokortinových receptorů tím, že není aktivován α-MSH, β-MSH a γ-MS, ale reaguje pouze na ACTH a selektivně indukuje produkci glukokortikoidů v kůře nadledvin (Lonati et al. 2020). MC2R byl také nalezen v tukové tkání, avšak jeho vliv na ni není prozatím objasněn.

1.13.3. MC3R

Je exprimován v mnoha místech v centrální nervové soustavě a gastrointestinálním traktu či placentě; jako fyziologicky významná se jeví největší afinita γ-MSH k tomuto receptoru. Role MC3R v obezitě není zcela zřejmá, jelikož je spíše indikován jako predispozice k obezitě, než jako obezitogenní faktor (Wang et al., 2021).

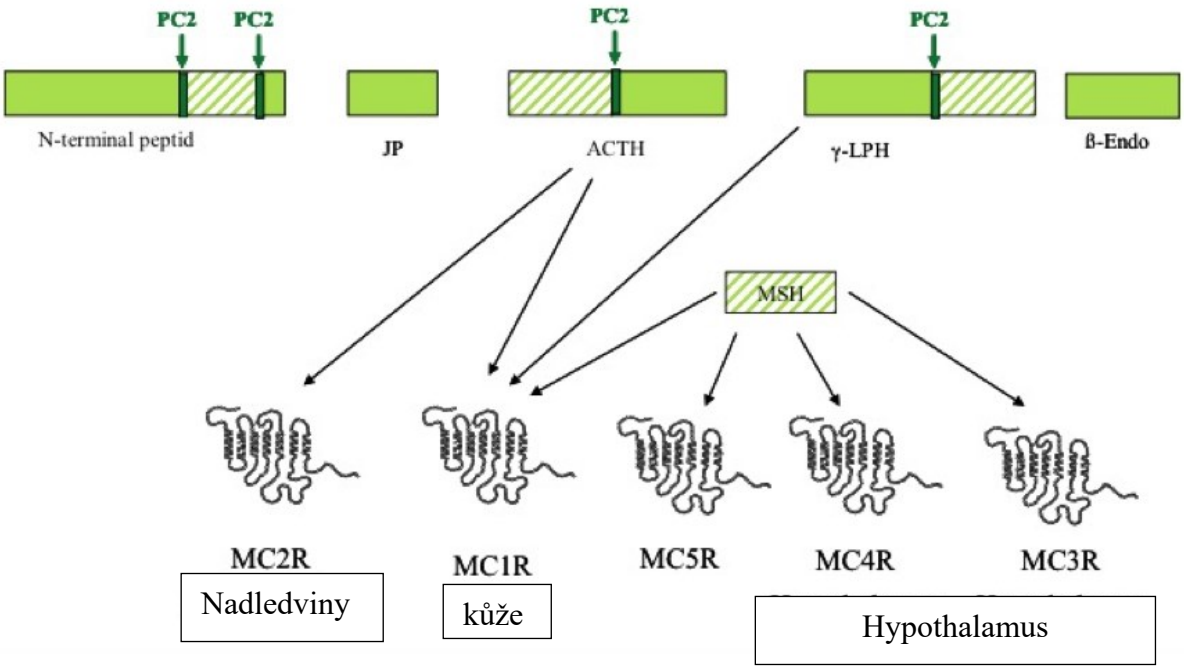
MC3R je taktéž exprimován v lymfocytech a makrofázích, kde zprostředkovává protizánětlivé účinky agonistů MC3R.

1.13.4. MC4R

Je primárně exprimován v centrální nervové soustavě a je zapojen v energetické rovnováze, obdobně jako MC3R. MC4R rovněž zprostředkovává aktivaci anti-apoptických drah, a je spojován s nocirepcepci (vznik a přenos signálu o bolesti) a neuroprotekci (Kishi et al., 2003).

1.13.5. MC5R

Široce exprimovaný receptor převážně v exokrinních žlázách. Přítomnost MC5R na B-lymfocytech a T-lymfocytech naznačuje roli v regulaci imunitního systému a zánětlivých procesech (Moscowitz et al. 2019). Tento receptor, stejně jako MC1R a MC4R má vysokou afinitu k α-MSH a o trochu méně k ACTH. (Wang et al., 2019).



Obrázek 5.: Role pěti melanokortinových receptorů aktivovaných peptidy ze štěpení POMC. MC1-5: Melanokortinové receptory 1-5, MSH – melanocyty stimulující hormon, PC2: Prokonvertáza 2, JP: Spojený peptid, Endo-β: β-endorfiny. Upraveno dle (Dubern,, 2015).

2. Fyziologie sytosti a hladu

2.1. Krátkodobá regulace příjmu potravy a energetické homeostáze

Krátkodobá regulace je zprostředkovávaná periferními signály z jater a gastrointestinálního traktu. Bezprostřední přítomnost potravy v zažívacím ústrojí je detekována receptory a chemoreceptory, které uvolňují peptidy, a tím signalizují mozku neurálními a endokrinními mechanismy informace o krátkodobé regulaci chuti k jídlu a sytosti.

Regulace zahrnuje signály, které zahajují ukončení příjmu potravy a modulují příjem dalšího jídla. Signály mohou jít přes mozkový kmen (aferentní signály n. vagus) nebo neurony v hypothalamu.

2.2. Dlouhodobá regulace příjmu potravy a energetické homeostaze

Dlouhodobá regulace příjmu potravy, stejně jako krátkodobá regulace, zahrnuje signály z periferie, jelikož některé gastrointestinální (GI) peptidy ovlivňují krátkodobou i dlouhodobou kontrolu nad příjmem potravy. Mnoho z dlouhodobých signálu indikuje metabolický status a jsou odvozeny z tukové tkáně; mezi ty řadíme i leptin a inzulin. Inzulin se dostává do mozku skrze hematoencefalickou bariéru pomocí receptoru. Zvýšení hladiny inzulínu jako odpověď na glukozovou zátěž je proporcionální k tukové hmotě. Cirkulující hladiny leptinu jsou proporcionální k adipozitě. U lidí se hladiny leptinu zvyšují po pár dnech přejídáni se a znovu se snižují s půstem (Hainerová et al., 2010; Kim et al., 2018).

2.3. Regulační peptidy

Mezi nejdůležitější peptidy, které ovlivňují chování při příjmu potravy, patří Cholecystokinin (CCK), Ghrelin a Glukagonu podobné peptidy 1 a 2 (GLP-1 a 2).

2.3.1. Cholecystokinin

Peptidový hormon CCK je rychle uvolňován z proximální části tenkého střeva a aktivuje žaludeční a duodenální aferentní neurony n. vagus, které jsou citlivé na množství a/nebo složení jídla. Zejména proteiny a tuky v potravě stimulují uvolnění CCK (Hopkins et al., 2000). Vzhledem ke krátkému poločasu rozpadu má CCK jen krátkodobý účinek. U myší byla pozorována synergická interakce leptinu a CCK, která přispívala k snížení příjmu potravy (Okonkwo et al., 2020).

2.3.2. Ghrelin

Ghrelin je 28 aminokyselin dlouhý peptid, převážně sekretovaný žaludkem, který funguje na základě aktivace ghrelinových receptorů v mozku, hypofýze a nadledvinách; jedná se o jediný známý periferní orexigenní signál. Účinkuje na neuronech AgRP/NPY nukleus arcuatus, kde aktivuje tyto orexigení buňky a současně inhibuje anorexigenní POMC buňky zvyšováním vypouštění kyseliny gama amino-máselné (GABA). Biologická aktivita ghrelinu je závislá na přítomnosti kyseliny n-oktanové (n-octanoic acid), tedy volné mastné kyseliny, která je enzymatickou acylací připojena na ghrelinovy peptid na třetí aminokyselinu (serin 3). Při hladovění byly zjištěny zvýšené hladiny ghrelinu v plasmě; naopak příjem potravy ukázal rychlé snížení hladin v plasmě (Abizaid, 2019; Smith et al., 2008).

2.3.3. Glukagonu podobný peptid 1

Peptid GLP-1 je produktem posttranslačního zpracování proglukagonu v L - buňkách gastrointestinalniho traktu. Je to takzvaný inkretin, neboli hormon, který stimuluje syntézu a sekreci inzulinu v β-buňkách pankreatu a zároveň stimuluje růst a množení těchto buněk. V periferních oblastech GLP-1 stimuluje sekreci na glukóze závislého inzulínu (glucose-dependent insulin), čímž inhibuje vyprazdňování žaludku, a tím pádem zpomalení rychlosti vstřebávání živin do krevního oběhu. GLP-1 se s vysokou afinitou váže na své receptory v hypothalamu, mozkovém kmeni a limbickém systému. Tato vazba může způsobit krátkodobý pocit sytosti a potlačení chuti k jídlu (Huang et al., 2019).

2.3.4. Amylin

Amylin je 37 aminokyselin dlouhý gastrointestinální hormon, který je produkován v pankreatu β-buňkami vně Langerhansových ostrůvku. Sekrece amylinu sleduje sekreci inzulínu, ale je také stimulována mastnými kyselinami a argininem. Mezi nejdůležitější funkce amylinu patří glykemická regulace a snižování příjmu potravy (Hay et al., 2015).

3. Nejčastější příčiny obezity

3.1. Polygenní obezita

Polygenní obezita je nejčastěji se vyskytující příčinou obezity; je výsledkem kumulativního efektu mnoha genetických variant s mírnými individuálními vlivy a jejich interakcí s prostředím. Mnoho úsilí bylo vloženo do rozklíčování faktorů podílejících se na příčinách obezity a zvláštní pozornost byla věnována genům zapojeným v leptin-melanokortinove dráze a jiným genům zapojeným v energetické homeostázi. Objevení nových lokusů způsobující obezitu je nicméně limitováno dosud známými signalizačními dráhami, což zapříčinilo posun směrem k celogenomovým asociačním studiím (GWAS). Nejpravděpodobnější asociace byla zaznamenána mezi BMI a FTO (fat mass and obesity) genem. Klastry malých nukleových polymorfismů (SNPs) byly opakovaně nacházeny v prvním intronu FTO u obézních dětí i dospělých.

Většina polymorfismů nalezených metodou GWAS je umístěna v nekódujících regulačních chromosomálních oblastech, což nasvědčuje možnosti, že rozvoj metabolických chorob způsobují epigenetické variace. Studie ukazují, že DNA metylace může přispívat k multifaktoriální patogenezi obezity (Diels et al., 2020).

3.2. Syndromová obezita

Syndromová obezita je obezita vyskytující se společně s definovaným souborem asociovaných klinických fenotypů. Je známo kolem třiceti mendelických poruch s obezitou jako variabilním nebo stabilním klinickým příznakem.

V mnoha případech je defektivní genový produkt intracelulární protein, hojně exprimovaný po celém těle a bez známé funkce. Nejčastější syndromy spojené s obezitou jsou Prader-Williho syndrom, Bardet-Biedlův syndrom a Alstromův syndrom (Chung, 2012; Chung et al., 2005).

3.3. Monogenní obezita

Monogenní obezitou je postiženo méně než 5 % všech morbidně obézních jedinců. Jedná se o mutaci konkrétního genu zapojeného ve stěžejních metabolických procesech, a to především do leptin-melanokortinové dráhy, která vyvolá krajní fenotypový projev, kterým je časně se projevující morbidní obezita.

Mezi typické fenotypové příznaky patří, kromě již zmíněné časně se projevující morbidní obezity, také hyperfagie a časté endokrinní abnormality jako hypogonadismus či deficience růstového hormonu. Pro pacienty trpící monogenní obezitou není standardní léčba změnou životního stylu příliš efektivní. Bariatrické operace byly do nedávna jedinou možnou dlouhodobou léčbou morbidní obezity. Studie, které sledovaly pacienty s *LEPR* deficiencí, vykazovaly nejasné výsledky, kdy u spolupracujících pacientů byly viditelné úbytky hmotnosti až 44 %, a co je důležitější, i udržení nižší váhy i po 8 letech od operace (Le Beyec et al., 2013). Nicméně u pacientů s horší mírou spolupráce byly dlouhodobé výsledky operace téměř neznatelné a pacienti byli schopni do jednoho roku dosáhnout předoperační váhy. Tyto výsledky pravděpodobně naznačují důležitost rodinného zázemí, pokud by měly bariatrické operace vést k dlouhodobému pozitivnímu výsledku.

U monogenní obezity je popisována klasická mendelovská dědičnost s tím, že většina případů je recesivní, tj vyžaduje dvě nefunkční kopie genu v homozygotní nebo složené heterozygotní formě (jiné genové mutace na obou alelách), aby se fenotyp projevil (Baxter et al., 2019).

4. Vybrané geny způsobující monogenní obezitu

4.1. *LEP* – leptinový gen

Gen *LEP* známy pod původním označením *OB (ob u myší)* je umístěn na 7. chromozomu na pozici 7q31.3.

Zahrnuje 3 exony oddělené 2 introny. Produkt je syntetizován jako 167 aminokyselin dlouhý protein, který musí projít štěpením na N-terminálním konci.

Vrozená leptinová deficience je recesivně dědičná, pročež se častěji vyskytuje v zemích s výskytem příbuzenských sňatků (např. Pákistán či Turecko). Je známo pouze malé množství mutací *LEP*, které způsobují monogenní formu obezity (Wasim et al., 2016). Jedinci s leptinovou deficienci mohou být léčeni rekombinantním leptinem a to s velice dobrou prognózou. Pro pacienty s *LEP* deficienci jsou typické velice nízké hladiny leptinu v séru (Funcke et al., 2014).

4.2. *LEPR* – gen pro leptinový receptor

Gen pro *LEPR* je umístěn na 1. chromozomu na pozici 1p31.3.

Mutace v genu pro leptinový receptor je taktéž recesivně dědičná a může způsobovat velice podobný fenotyp jako u leptinové deficience, avšak s velice vysokými hladiny leptinu v séru. Pomocí sekvenace nové generace byly identifikovány *LEPR* mutace, které se u některých populací vyskytují s prevalencí 2-3 % (Niazi et al., 2018).

4.3. *POMC* – gen pro proopiomelanokortin

Gen pro *POMC* je umístěn na 2. chromozomu na pozici 2p23.3.

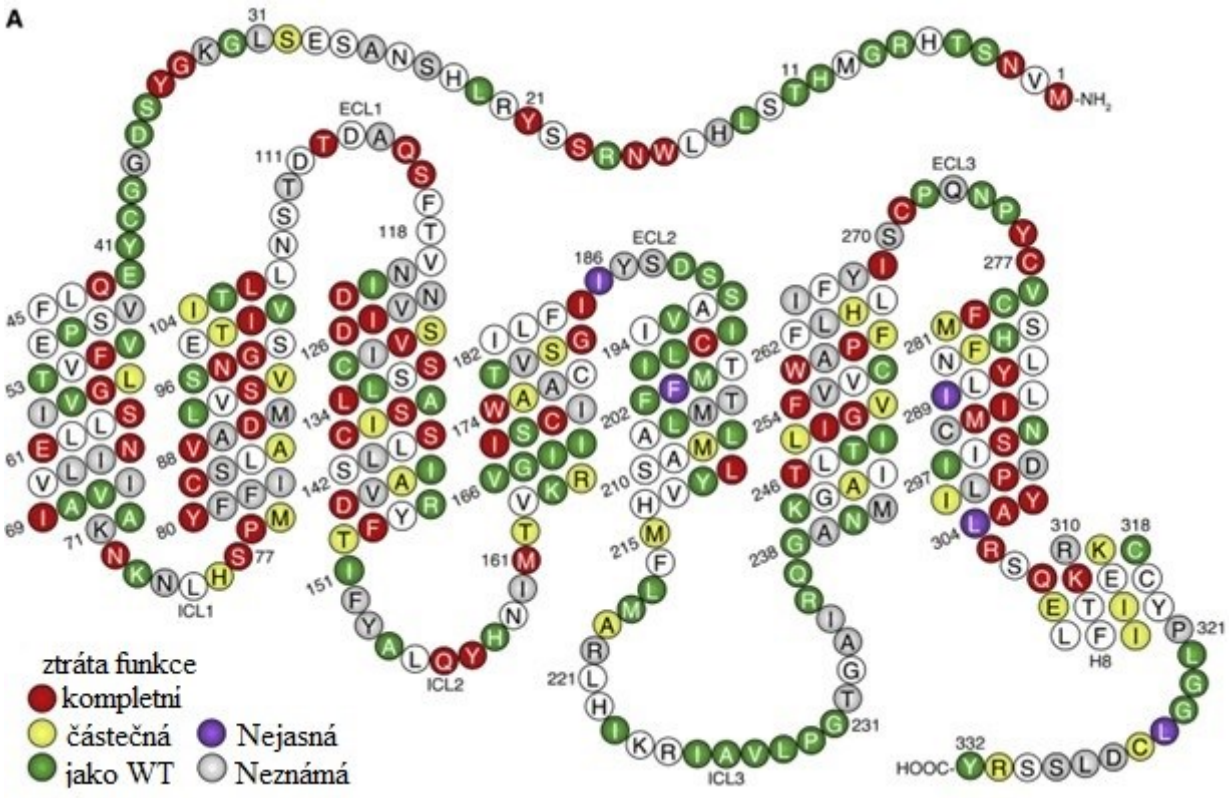
Nedostatečnost v POMC znamená absenci všech posttranslačních produktů jako jsou α-MSH a ACTH. Kvůli své roli v regulaci chuti k jídlu a pigmentaci je klasickým fenotypem morbidní obezita a rusé vlasy; deficience v ACTH vede i k nadledvinové nedostatečnosti. *POMC* mutace jsou ale velice vzácné s autozomálně recesivní dědičností. Pacienti v heterozygotní stavu nemají tak silný obézní fenotyp a je většinou bez nadledvinové nedostatečnosti (Cohen et al., 2016).

4.4. *MC4R* – gen pro melanokortinovy receptor 4

Gen pro *MC4R* je umístěn na 18. chromozomu na pozici 18q21.32.

Je to receptor spřažený s g proteinem, který obsahuje 7 transmembránových domén viz obrázek 6. Je vysoce exprimován v hypothalamu, kde se podílí na regulaci signálu hladu a sytosti. Při navázání se α-MSH na MC4R je omezen příjem jídla. Mutace v *MC4R* je nejčastější příčinou dědičné monogenní obezity a může být jak autozomálně dominantní, tak i autozomálně recesivní. Je známo mnoho mutací *MC4R*, které jsou patogenní nebo potenciálně patogenní; většina z nich jsou frameshift mutace a způsobují různě závažné ztráty funkce (Farooqi et al., 2009).

Nejčastějšími jednonukleotidovými polymorfismy (SNP) jsou rs17782313 a rs12970134, které se nacházejí 188kB a 154 kB downstream od genu pro MC4R. Oba tyto SNP jsou asociované s obecnou obezitou z Asijských a Evropských populací. Tento gen je studován i u polygenní obezity (Wang et al., 2017; Yu et al., 2020).



Obrázek 6.: - Melanokortinový receptor 4, genetické a molekulární klasifikace MC4R mutací. WT – Standartní alela (wild type). Upraveno dle (Collet et al,. 2017).

4.5. *SIM1* – gen pro single minded homolog 1

Gen pro *SIM1* je umístěn na 6 chromozomu na pozici 6q16.3.

Single minded je transkripční faktor, který je silně exprimován v nukleus paraventricularis hypothalamu. Delece nebo heterozygotní mutace v SIM1 jsou asociovány s hyperfagii a s neurobehaviorálními obtížemi jako je zhoršená koncentrace, problémy s pamětí a emoční labilita (Gonsalves et al., 2020).

Studie naznačují autozomálně dominantní dědičnost (Ramachandrappa et al., 2013).

4.6. *PCSK1* – gen pro proprotein konvertázu subtilisin/kexin 1 typu

Gen pro *PCSK1* se nachází na 5 chromosomu na pozici 5q15.

Prokonvertáza – 1/2 je neuroendokrinní endoproteáza, která zpracovává velké prekurzory na biologicky aktivní produkty. Při absenci PC1/2 je možné detekovat nedostatečnost nadledvin, gonadotropinu, somatotropinu a thyreotropinu spolu s morbidní obezitou, diabetes insipidus a chybějícím inzulínovým zpracováním (Creemers et al., 2012). Dědičnost *PCSK1* je popisována jako autozomálně dominantní (Philippe et al., 2015).

4.1. *BDNF/NTKR2* – gen pro z mozku odvozený neurotrofický faktor a jeho receptor

Gen pro z mozku odvozený neurotrofický faktor je umístěn na 11 chromozomu na pozici 11p14.1; gen pro neurotroficky receptor tyrosin kinázu 2 je umístěn na 9 chromosomu na pozici 9q21.33.

Oba tyto geny produkují neurotrofiny z rodiny růstových faktorů, zapojených ve vývoji a udržování funkce periferních a centrálních nervů. Neurotrofický receptor TrkB a jeho přirozený ligand BDNF (brain derived neurotrofic factor) byly implikovány v regulaci příjmu potravy a tělesné hmotnosti. Insuficience BDNF je spojována s hyperaktivitou, porušením kognitivních funkcí a časně se projevující obezitou (Gray et al., 2006; 2007). NTKR2 patří ke genům, které se dědí autozomálně dominantně.

5. Možnosti léčby

5.1. Liraglutide

Liraglutide je dlouho působící derivát glucagonu podobný peptid 1 (GLP-1), se kterým sdílí 97% podobnost ve struktuře aminokyselin, avšak pro velikou nestabilitu GLP-1, kdy v krvi dochází k rychlému štěpení dipeptidyl peptidasou-IV, byl arginin obsažený v liraglutidu substituován za lysin na pozici 34 a přidán řetězec kyseliny palmitové s kyselinou glutamovou na lysinový zbytek na pozici 26 (Coghlan et al., 2013).

Nejnovější studie potvrzují schopnost GLP-1 potlačit pocit hladu, snížit příjem potravy, zpomalit gastrointestinální motilitu a opozdit vyprazdňování žaludku. Menší analogy GLP-1, jako je třeba Liraglutide, procházejí hematoencefalickou barierou a snižují chuť k jídlu ovlivňováním GLP-1 receptorů v hypothalamu v nukleus paraventricularis, limbickém systému a zadním mozku, stejně jako přirozený GLP-1 hormon (Hunter et al., 2012; Trujillo et al., 2014).

Liraglutid je obecně velice dobře snášen jako dlouhodobý prostředek k dosažení úbytku hmotnosti. Mezi nejběžnější vedlejší účinky patří nevolnost, hypoglykemie, průjem, zvracení, dyspepsie, bolesti hlavy, zácpy, únava, závratě, zvýšené hladiny lipázy, jakož i akutní pankreatitida. Prevalence nevolnosti napříč studiemi dosáhla až 50 %, nicméně následně docházelo k poklesu jejího výskytu po prvních 8 týdnech léčby.

Jednou z výhod GLP-1 receptorových agonistů je také nízké riziko hypoglykémie, a to vlivem stimulace inzulínu a inhibicí glukagonu. Zvýšená pozornost by měla být věnována pacientům se sníženou renální nebo jaterní funkcí, a to i přes to, že studie prokázaly bezpečnost aplikace i u těchto pacientů. U myší a potkanů způsobuje liraglutide nádory C-Buněk štítné žlázy. Studie na 6000 lidech nicméně neprokázaly zvýšené riziko medulárního karcinomu štítné žlázy (Patel et al., 2018).

Další kontraindikací jsou těhotné a kojící ženy, děti a pacienti užívající inzulín a další agonisty GLP-1.

Po subkutánním podání Liraglutide nastává absorpční vrchol po 9 až 12 hodinách. Poločas rozpadu u zdravého jedince, jakož i u jedince s diabetem 2. typu, nastává po 13

hodinách, což dovoluje injekční podávání jednou denně. Snížení hmotnosti pacienta závisí na množství látky v podané dávce a je progresivní (Lin et al., 2020).

Studie provedená na pacientech s mutací MC4R prokázala, že po 16 týdnech dochází ke snížení tělesné hmotnosti, podílu tuku v těle, zlepšení glukozové tolerance a koncentrace lipidů v plazmě u pacientů s deficientním MC4R, jakož i u kontrolní skupiny. U pacientů s MC4R je léčba liraglutidem spojena se sníženým rizikem budoucích komorbidit jako jsou kardiovaskulární příhody a s tím spojená mortalita (Iepsen et al., 2018).

Studie také prokázaly účinnost oproti užití placeba, a srovnávací data naznačují, že úbytek hmotnosti je o mnoho vyšší než u orlistatu nebo lorcaserinu, avšak o něco menší nežli u kombinace Topiramate/Phentermine (Mehta et al., 2017; Wharton et al., 2019).

V současné době jsou nicméně platné kontraindikace pro děti, které prakticky vylučují větší nasazení liraglutidu pro léčbu monogenní obezity. Otázkou tedy zůstává, zdali v tomto směru proběhnou klinické studie (Hainerová, 2013).

5.2. Methylphenidate (MPH)

Methylphenidate (methyl fenyl(piperidin-2-yl) acetát) je psychomotorický stimulant, který snižuje pocit hladu a příznivě působí na snižování hmotnosti. Je to sympatomimetický lék hojně užívaný k léčbě ADHD, jelikož snižuje hyperaktivitu a podporuje soustředění. Jako nejčastější vedlejší účinek byla popsána ztráta hmotnosti až anorexie.

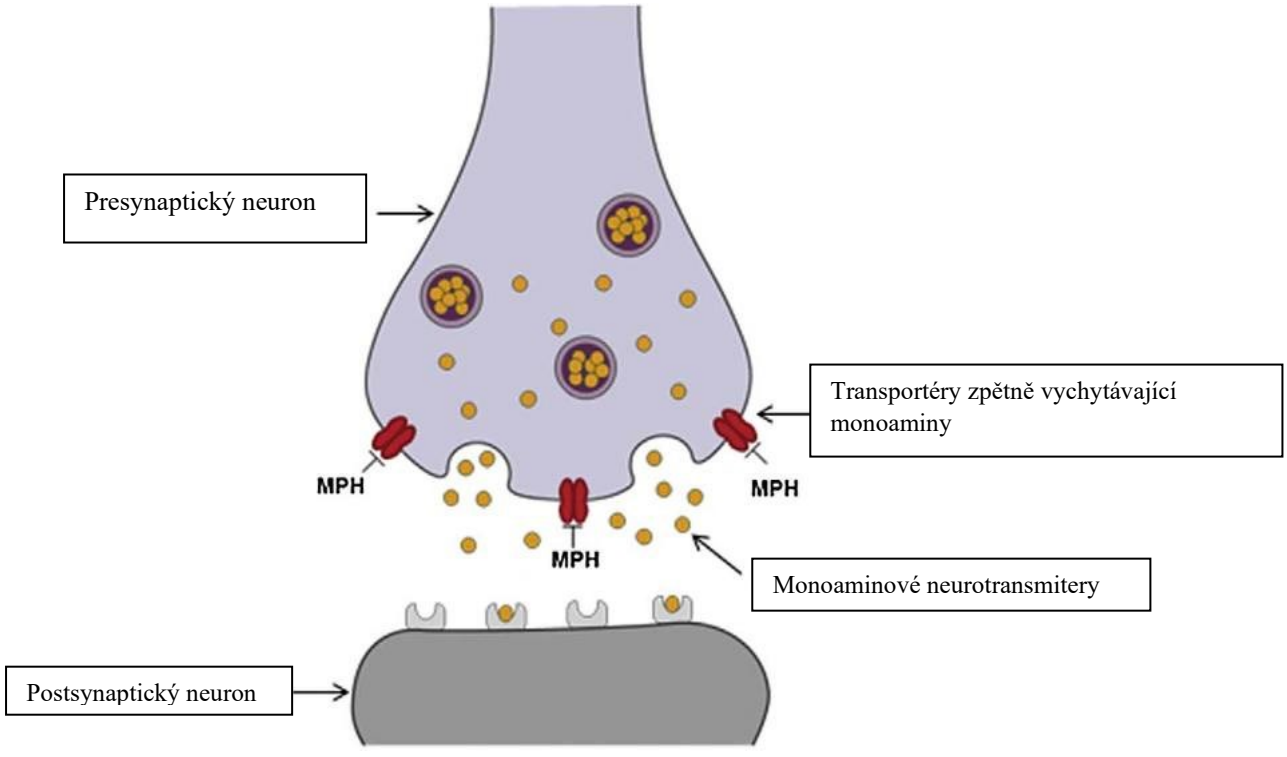
MPH nejspíše funguje na principu Inhibice transportu a blokace zpětného vychytávání dopaminu, čímž zvyšuje koncentraci presynaptického dopaminu a noradrenalinových hladin v oblastech mozku zodpovědných za motivaci, pocit odměny a pozornosti viz obrázek 7.; ve výsledku vysoké hladiny dopaminu snižují reward value a motivaci přijímat potravu (Leddy et al., 2004).

Studie, které zkoumaly efekt MPH u dětí s monogenní obezitou, a to zejména s *MC4R* a *LEPR* mutacemi, ukázaly, že použití tohoto léku zlepšilo jejich váhovou křivku a snížilo chuť k jídlu (Brandt et al., 2020).

2 – Benzyl piperidinová struktura je blízce podobná katecholaminům a fenylethylaminům s piperidinylovou skupinou substituující amin. Podobně jako amphetaminy MPH konkuruje s katecholaminy v centrálním nervovém systému (Carlier et al., 2019). Po požití je MPH rychle a celkově vstřebán sliznicí gastrointestinálního traktu; koncentrační vrchol nastává po 1 až 2 hodinách od požití. Rozpadový poločas se různí a jedná se o interval od 2 do 7 hodin.

Lék dobře prochází hematoencefalickou bariérou do mozku. MPH je metabolizován esterifikací enzymy GI. Látka je rychle odstraněna jako kyselina ritalinová, pročež nenastává žádné hromadění aktivní látky v těle.

Jako nežádoucí účinky byly popsány psychické poruchy, arytmie, dilatace zornic, vypadávání vlasů, deprese, anorexie, bolesti hlavy, snížené libido, nespavost, úzkost a hypersenzitivita (Státní ústav pro kontrolu léčiv). Vzhledem ke své podobnosti k amphetaminům je MPH látkou podléhající mezinárodní kontrole a při dlouhodobém používání je u MPH riziko vytvoření návyku a i možné fyzické závislosti (Morton et al., 2000; Rappley, 1997).



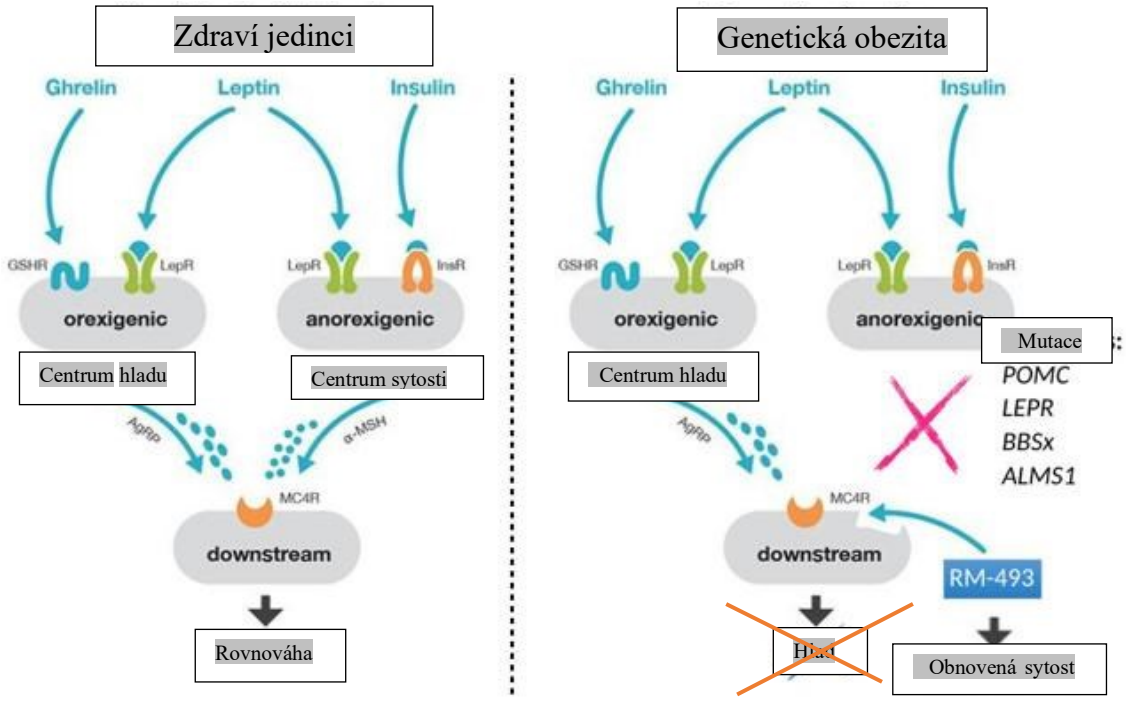
Obrázek 7.: Mechanismus fungování MPH v dopaminergních a adrenergních neuronech. MPH se váže do monoaminových transportérů a inhibuje zpětné vychytávání neurotransmiterů, tím zvyšuje jejich hladinu. Upraveno dle (Loureiro-Vieira et al., 2017).

5.3. Setmelanotid

Syntetický cyklický peptid odvozený od □□MSH, který se s vysokou afinitou váže a aktivuje lidský melanokortinový receptor 4 (Collet et al. 2017). Setmelanotid funguje jako náhrada za melanocyt stimulující hormony, a tudíž je jeho použití indikováno i v případě deficitu proopiomelanocortinu (POMC) nebo leptinového receptoru (LEPR) viz obrázek 8.; dále také nezávisle ovlivňuje inzulínovou senzitivitu (Clément et al., 2018; Kühnen et al., 2016).

Setmelanotidová terapie je obecně velice bezpečná, nicméně je spojena s malým, avšak statisticky významným zvýšením plazmatické glykémie na lačno, C-peptidu, triglyceridů, inzulínu, FFA (volné mastné kyseliny) a celkových hladin GLP-1 (glukagonu podobný peptide -1) a PYY (peptid tyrosin tyrosin); mezi další vedlejší účinky patří bolesti hlavy a nauzea (Kühnen et al., 2019; Srivastava et al., 2018).

Při randomizované, dvojitě zaslepené, placebem kontrolované klinické studii na obézních jedincích, ve které bylo subkutánně podáváno 1mg/den za 72 hodin, se oproti placebu zvýšil klidový energetický výdej o 6,4 %. Dlouhodobé podávání setmelanotidu opicím druhu makak rhesus zvýšilo glukozovou toleranci a snížilo triglyceridy v séru (Chen et al. 2015). V injekční formě je tento lék vyráběn pod názvem Imcivree a je aktuálně schválen k léčbě homozygotů nebo složených heterozygotů v genech *POMC, PCSK1, LEPR* u dospělých a dětí do 6 let. Ve schvalovacím procesu je využití setmelanotidu u Bardet-Biedlova a Alströmova syndromu.



Obrázek 8.: Způsob fungováni Setmelanotidu (RM-493). U zdravých jedinců jsou geny upstream od kaskády sytosti aktivní a MC4R signály aktivují signály sytosti. Mutace, které inaktivují geny upstream od MC4R způsobují trvalý hlad. Setmelanotid znovu obnovuje MC4R signalizaci a tím i obnovuje signály sytosti upraveno (Costa Coehlo, 2019).

6. Populační rozdíly v genetických predispozicích monogenní obezity

Ačkoli je lidský genom je z 99,9 % identický u každého jedince, evoluční síly jako je genetický drift, přírodní selekce nebo de novo mutace vedly k mírným genetickým změnám mezi populacemi. Již v rámci prvního velkého mezinárodního projektu zaměřeného na lidský genom (Human genome project, v letech 1990–2003), bylo identifikováno velké množství genetických variant s různou četností u rozdílných populací.

Jelikož bylo lidstvo historicky vystavováno dobám hladu, kdy schopnost efektivně uchovávat energii usnadňovalo přežití, má se za to, že vznikl takzvaný úsporný genom; nicméně v posledních dekádách, kdy potrava již není limitujícím faktorem a příjem energie se zvýšil, výhody plynoucí z těchto přizpůsobení se staly spíše přítěží a nositelská populace více náchylná k obezitě (Stryjecki et al., 2018).

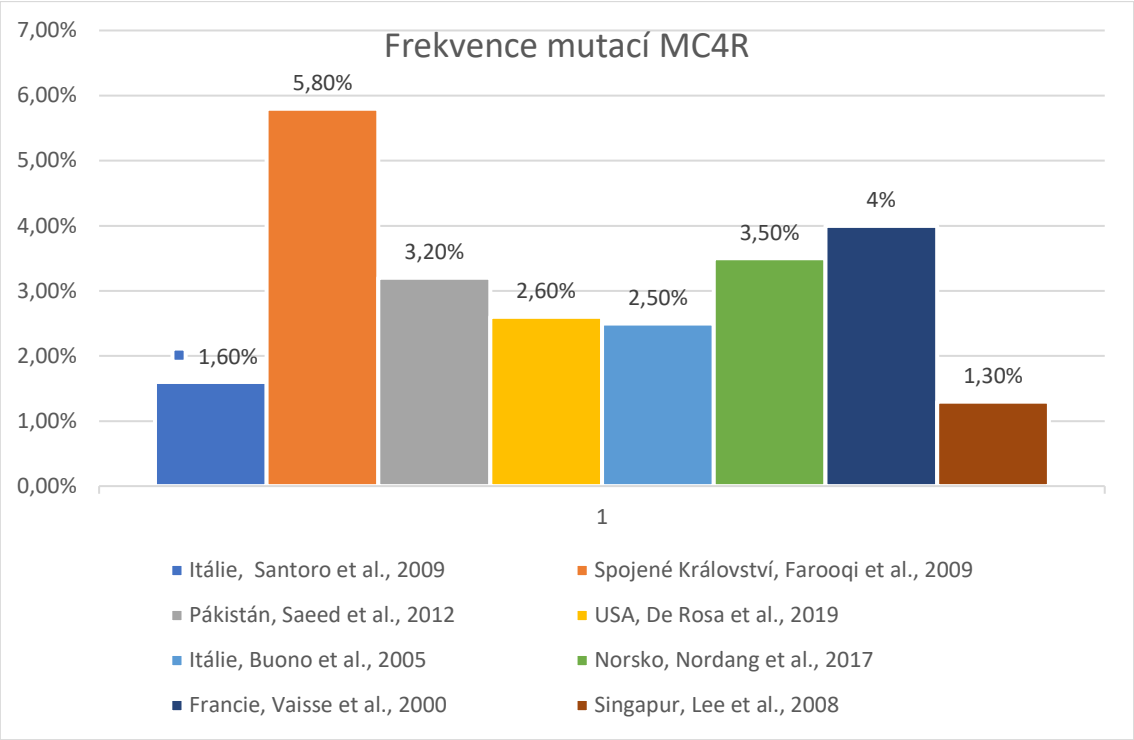
Například arizonští Indiáni kmene Pima mají největší prevalenci obezity (64 % u mužů a 75% u žen). Tito američtí indiáni jsou příkladem přechodu z tradičního zemědělského životního stylu k modernímu. Obecně panuje předpoklad, že geny k úspornému genomu získali při přechodu a osidlování pouště před tisíci lety (Schulz et al., 2006).

Monogenní obezita vykazuje mendelovskou dědičnost u homozygotních nebo heterozygotních mutacích způsobujících ztrátu nebo snížení funkcí u genů zapojených v leptin-melanokortinové dráze. Mutace s recesivní dědičností, charakteristické zejména u genu pro leptin a leptinový receptor, se ve valné většině vyskytují u populací s velkou četností příbuzenských sňatků, jako je například Pákistán či Sýrie, nebo v uzavřených populacích (oázy, horská údolí, náboženské skupiny). Srovnání výskytu monogenní obezity mezi jednotlivými populacemi je problematické, jelikož nejsou publikovány práce založené na totožné metodice a je jen málo prací, které by dokumentovaly výskyt monogenní obezity v populacích celkově. Převládají práce, kdy autoři uvádějí zastoupení tohoto onemocnění ve vybraných různě definovaných kohortách obézních (různého stupně obezity) a publikované kohorty mají odlišné věkové složení. Věk probandů ale ovlivňuje poměr zastoupení monogenní obezity ku obézním celkově. Výskyt je procentuálně vyšší u dětí s časnou morbidní obezitou než u dospělých, u kterých se na rozvoji jejich obezity dlouhodobě podílí vliv prostředí a jejich životního stylu. Z tohoto důvodu se v klinické praxi monogenní obezita vyšetřuje převážně u mladších dětí.

6.1. MC4R

Prevalence výskytu kauzálních mutací u *MC4R*, se pohybuje v české dětské populaci kolem 1-5/10 000 dětí (Orpha.net., 2022), čemuž zhruba odpovídá v literatuře uváděný výskyt od 0,2 % do 5,8 % u morbidně obézních dětí.

Studie z Velké Británie, která zkoumala 500 dětských probandů s časně nastupující morbidní obezitou s průměrným z-scóre BMI 4,5, vykázala prevalenci 5,8 % (Farooqi et al., 2009). Francouzská studie s 209 morbidně obézními dospělými probandy středního věku s BMI > 50 kg/m^2, prokázala prevalenci 4 % (Vaisse et al., 2000). Naopak mezi řeckou obézní dospělou populací s průměrným BMI 37,6 kg/m^2, se mutace v tomto genu objevila pouze u 0,20 % (Rouskas et al., 2012), nižší hodnoty 1,9 % záchytu kauzálních mutací byly zaznamenány také v německé populaci adolescentů s průměrným BMI 32,5 kg/m^2 (Hinney et al., 2003). Singapurská studie na 227 dětech, která ale neměla tak významně obézní skladbu dětí (průměrný věk 10 let, průměrné BMI 32,1 kg/m^2) jako Britské studie, odhalila mutace pouze u 1,3 % zúčastněných (Lee et al., 2008) viz obrázek 9.



Obrázek 9.: Frekvence mutací MC4R u morbidně obézních probandů v různých studiích

Zatímco homozygotní nebo heterozygotně složené mutace vedou k plně penetrantní formě časně nastávající morbidní obezity, mutace heterozygotní vedou k slabším méně penetrantním formám a někdy je nacházíme i u neobézních jedinců. Evropská populace s heterozygotními mutacemi vykazuje generační efekt s penetrancí 40 % u dospělých nad 52 let s deficiencí *MC4R*, 60 % u dospělých mezi 18 a 52 lety a 79 % u dětí (Stutzmann et al., 2008).

Nicméně u řecké heterozygotní populace byla prokázaná penetrance *MC4R* pouze 6,3 %, což je pozoruhodné zejména s přihlédnutím k faktu, že prevalence obezity v řecké populaci je kolem 18 %. Zajímavou je rovněž skutečnost, že zkoumaní pákistánští nosiči heterozygotní mutace měli normální váhu (Saeed et al., 2012). Tyto výsledky naznačují že, penetrance obezity u heterozygotních mutací *MC4R* mohou být do jisté míry ovlivňovány i prostředím (dostupností potravy) a životním stylem (Rouskas et al., 2012).

6.2. POMC

Prevalence kauzálních mutací u *POMC* v dětské populaci se udává na <1/1 000 000 (Orpha.net, 2022).

Varianty *POMC* genu byly nalezeny v německé studii zkoumající 96 morbidně obézních dětí (průměrné BMI 38,1 kg/m^2) (Hinney et al., 1998), italské studii s 87 dětmi a adolescenty s těžkým stupněm obezity (průměrné z-skóre 3,43) (Miraglia del Giudice et al., 2001), britské studii s 538 dětí s morbidní, časně nastupující obezitou (průměrné BMI SDS 3,8) (Lee et al., 2006) a švédské studii s 102 dospělými obézními probandy (průměrné BMI 41.3 kg/m^2) (Suviolahti et al., 2003).

Tyto varianty zahrnovaly inserce, delece, mutace měnící i neměnící smysl a obecně byly velice vzácné. Většina jich nebyla asociovaná s obezitou a neměla žádné dopady na funkci. Jedině u mutací, které zasahovaly do β-MSH domény (Arg236Gly a Tyr221Cys) byla prokázána spojitost s monogenní časně nastupující obezitou (Dubern et al., 2008).

6.3. SIM1

Studie zkoumající výskyt SIM1 u amerických indiánů kmene Pima a francouzských obézních dětí (BMI nad 97 percentilem pro pohlaví a věk) a dospělých (BMI ≥40 kg/m^2) zjistila heterogenitu mezi populacemi. Varianty, které u Pima indiánů byly asociovány s obezitou, u francouzské obézní populace nebyly. Rizikové alely spojené s obezitou byly mnohem častější u k obezitě náchylnějším Pima indianů (Traurig et al., 2009).

6.4. BDNF

Studie zabývající se asociací BDNF a BMI vykazují rozporuplné výsledky. Vyšší hladina BDNF v séru je v americké studii spojována mezi jinými se zvýšeným BMI, cholesterolem a tukovou tkání u žen (Golden et al., 2010). Taktéž v japonské studii u pacientů s diabetem 2. typu byla zjištěna zvýšená hladina BDNF oproti zdravým jedincům (Suwa et al., 2006).

Nicméně studie z Hong Kongu a Nizozemska na zdravých jedincích neprokázaly spojení mezi zvýšenou hladinou BDNF a BMI (Bus et al., 2011; Chan et al., 2008).

Je také zajímavé podotknout, že studie rovněž prokázaly vyšší hladinu BDNF u kuřáků, které se zvyšovaly s počtem vykouřených cigaret denně a také počtem let po kterou kouření trvalo (Bus et al., 2012; Jamal et al., 2015).

7. Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo stanovit mutační spektrum a frekvenční zastoupení jednotlivých variant ve vybraných genech spojených s monogenní obezitou, kódujících signalizační kaskádu melanokortinového receptoru 4. typu (geny *MC4R, POMC, SIM, BDNF*) u české obézní populace.

Konkrétní cíle práce byly:

I. Zvolení vhodné a ekonomicky výhodné technologie pro sekvenování velkého množství DNA u vybraných genů spojených s monogenní obezitou.

II. Identifikace variant zapojených v MC4R signalizační kaskádě ve vzorcích DNA získaných ze vzorků krve ze studie COPAT a vzorků zaslaných do Endokrinologického Ústavu na cílené vyšetření pro monogenní obezitu. Vytvoření DNA knihoven a následná sekvenace genů *MC4R, POMC, SIM, BDNF* u dostatečně validní kohorty české dětské a dospívající populace. Bioinformatické vyhodnocení sekvenačních dat. Anotace kauzálních variant.

III. Porovnání výskytu kauzálních variant způsobujících monogenní obezitu v reprezentativním vzorku české populace oproti obézní populaci a srovnání těchto zjištění vůči jiným populacím.

8. Materiál a metody

8.1. Materiál

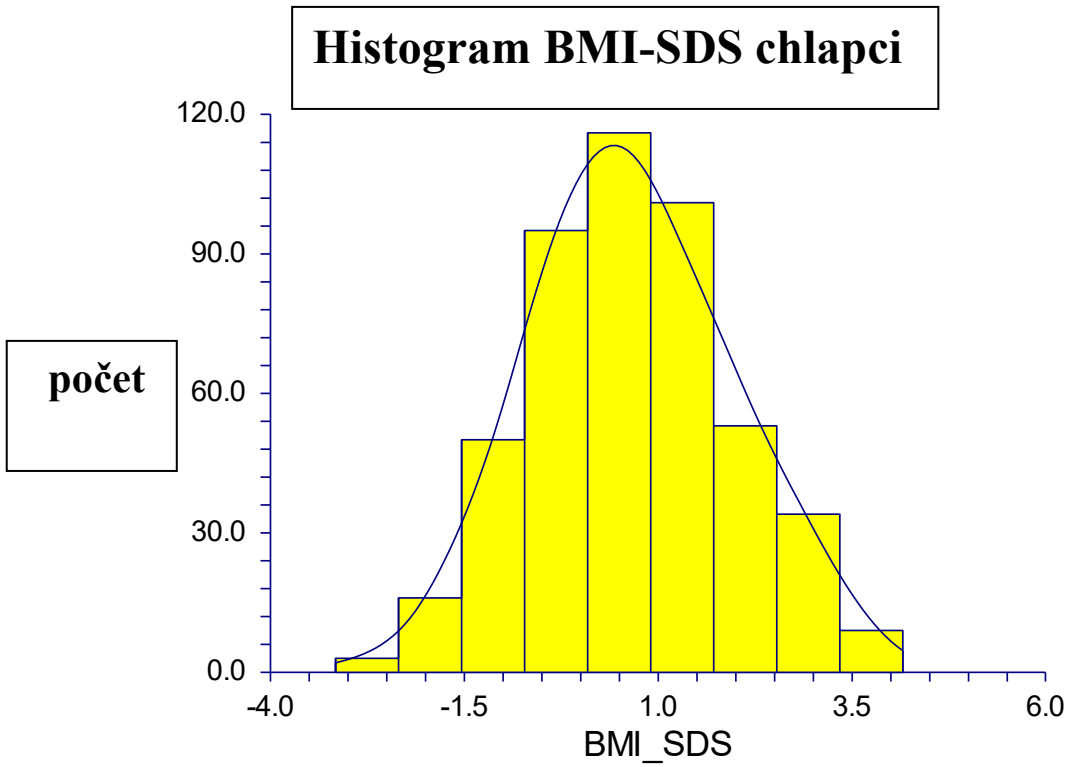
V této práci byla analyzována DNA (celkem 1910 vzorků) a data ze 4 souborů získaných v předchozích projektech Endokrinologického ústavu (DNA banka). A to dvou souborů adolescentů z projektu COPAT (Childhood Obesity Prevalence And Treatment) financovaného z Norských fondů (dostupné na https://www.endo.cz/projekt-copat), který byl zaměřen na sledování výskytu obezity a ukazatelů metabolického syndromu a včasnou diagnostiku a léčbu nadváhy a obezity u dětí a adolescentů. Třetí soubor vzorků pochází z rutinní klinické diagnostiky monogenní obezity na Endokrinologickém ústavu. Tyto tři soubory doplnily vzorky morbidně obézních dětí z Fakultní nemocnice Olomouc. Ke všem analyzovaným vzorkům byl připojen informovaný souhlas pro jejich výzkumné využití.

Pro dětskou a adolescentní populaci je místo BMI používána standardizovaná verze toho parametru pro jednotlivé věkové skupiny a pohlaví tzv. Z-skóre BMI (v grafech označováno jako BMI-SDS). Pro výpočet Z-skóre BMI byl použit program Státního zdravotního ústavu RůstCZ, který obsahuje populační růstová data české dětské a adolescentní populace. Tento program vypočítává Z-skóre BMI z měřených hodnot probanda k průměrům a referenčním odchylkám jednotlivých věkových skupin referenční populace. (dostupné na http://www.szu.cz/publikace/data/program-rustcz-ke-stazeni)

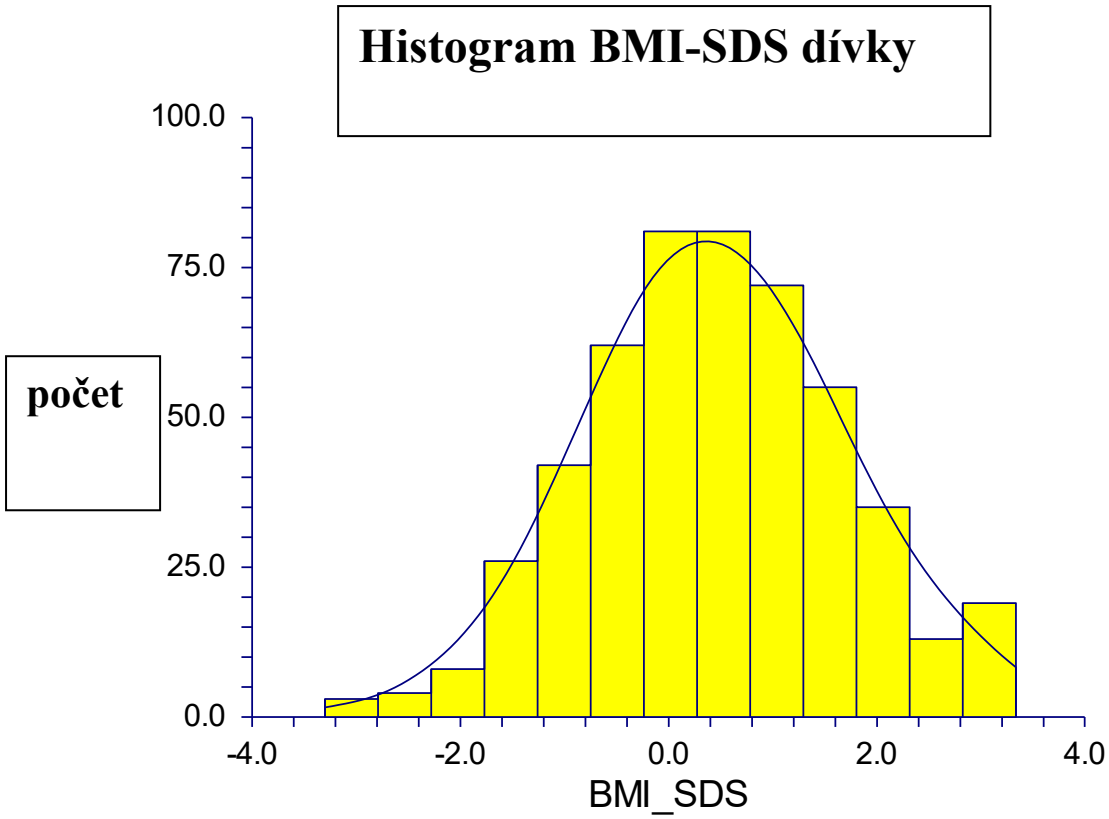
Vzorky z epidemiologické studie COPAT (dále značeny jako E), které zahrnují epidemiologický screening výskytu obezity, abdominální obezity a ukazatelů metabolického syndromu u reprezentativního vzorku českých adolescentů, byly získány randomizovaným výběrem pediatrických ordinací z celé ČR. Tento reprezentativní vzorek české adolescentní populace obsahuje n=978 jedinců ve věku od 13 do 18 let a zahrnuje adolescenty všech percentilových skupin viz tabulka 1. a obrázek 10. a 11.

COPAT Epidemiologie	Počet	Střední hodnota věku	Standardní odchylka	Minimální věk	Maximální věk
Dívky	501	15,95	1,298	13,05	18,41
Chlapci	477	15,99	1,27	13,01	18,03

Tabulka 1.: Rozdělení dle pohlaví a věku [roky]



Obrázek 10.: Histogram BMI-SDS u chlapců ze souboru COPAT epidemiologie

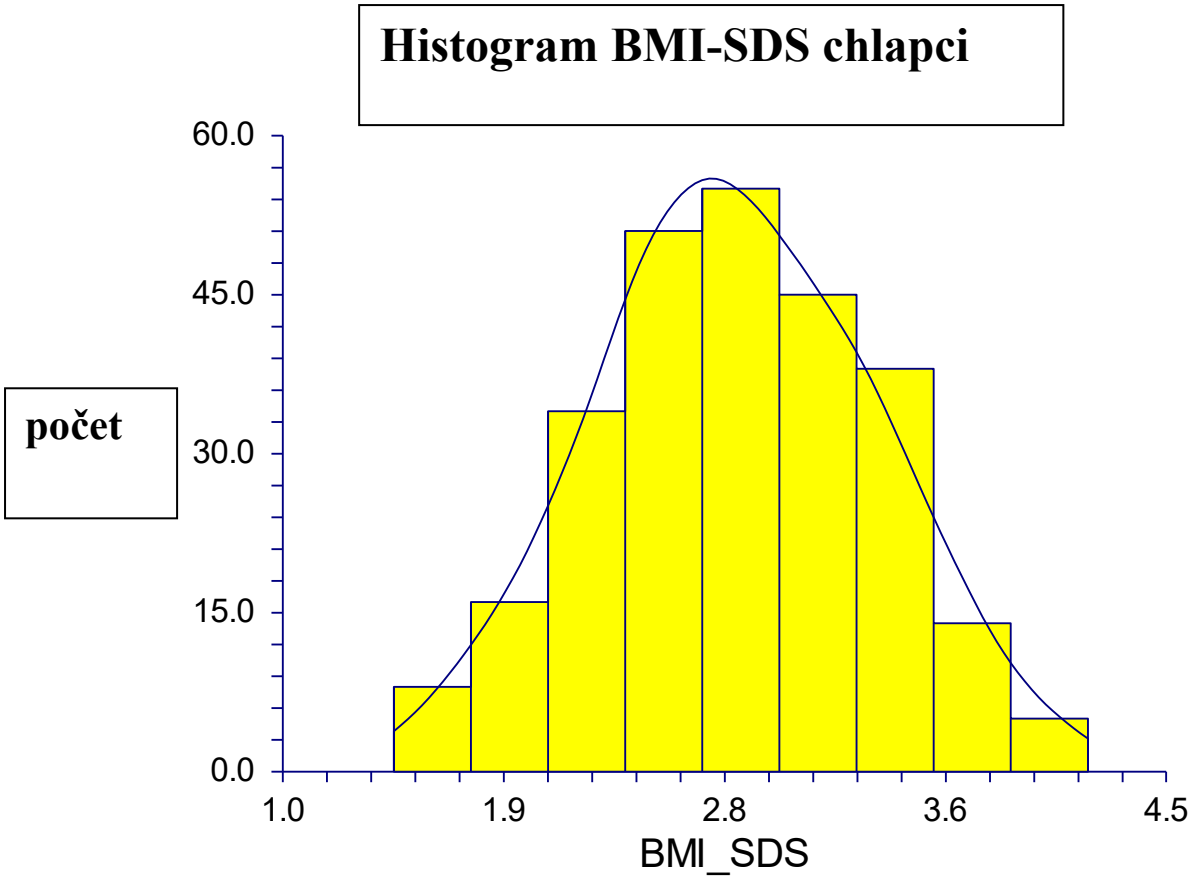


Obrázek 11.: Histogram BMI-SDS ze souboru COPAT epidemiologie dívky

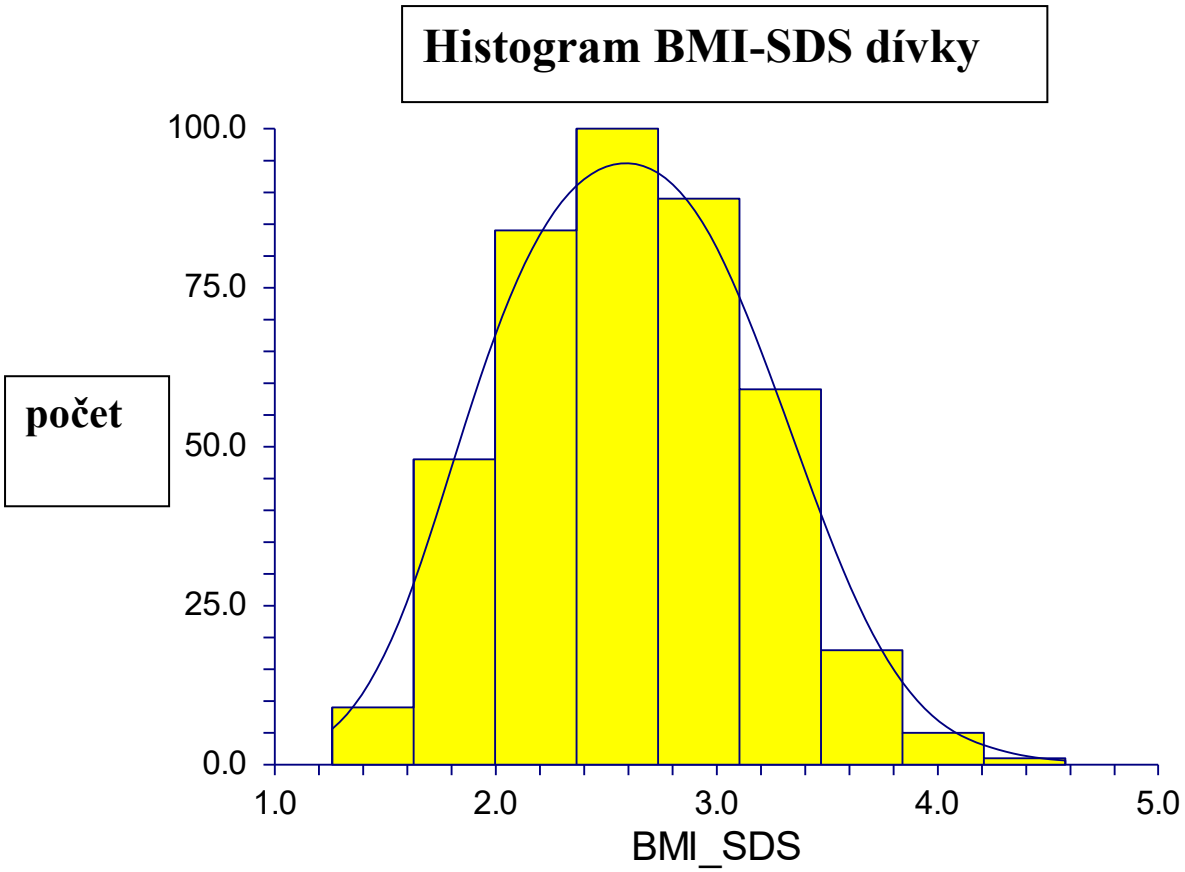
Vzorky z intervenční studie COPAT (dále v textu značeny I), které sledovaly průběh a úspěšnost redukční léčby u obézních dětí a adolescentů, sledování faktorů ovlivňujících vznik, vývoj a léčbu obezity, zahrnovaly obézní děti, které podstupovaly lázeňský ozdravný pobyt. Tento soubor obsahuje n=679 jedinců ve věku od 7 do 18 let nad devadesátým hmotnostním percentilem viz tabulka 2. a obrázek 12. a 13.

COPAT Intervence	Počet	Střední hodnota věku	Standardní odchylka	Minimální věk	Maximální věk
Dívky	413	14,57	2,154	7,67	18,98
Chlapci	266	14,07	1,825	7,51	18,76

Tabulka 2.: Rozdělení dle pohlaví a věku [roky]



Obrázek 12.: Histogram BMI-SDS ze souboru COPAT intervence chlapci



Obrázek 13.: Histogram BMI-SDS ze souboru COPAT intervence dívky

Dalším souborem bylo n=199 vzorků morbidně obézních dětí, zaslaných pediatry z celé ČR do Endokrinologického ústavu (pacienti indikovaní k vyšetření monogenní obezity, dále v textu značeny OMK), pro cílené vyšetření genů pro monogenní obezitu. V souboru byly pouze děti s morbidní obezitou s BMI nad 97,5 percentilem pro danou věkovou skupinu a pohlaví.

Posledním souborem je n=47 vzorků DNA morbidně obézních dětí zaslaných z Fakultní nemocnice Olomouc, u kterých nebylo známo pohlaví ani věk pacientů, a jednalo se tak o anonymizované DNA bez klinických údajů.

8.2. Použité reagencie

Etanol 96% [V/V]

Voda pro injekční účely (B. Braun)

8.2.1. Roztoky

TE Pufr (10mM Tris, 0.1mM EDTA, pH 8,0)

Etanol 80% [V/V]

Komerční soupravy

QuickGene DNA whole blood kit (Kurabo, Japan)

Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)

Advanta NGS Library Prep Reagent Kit—LP 192.24 (Fluidigm, USA)

NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2 (300 cycles) (Illumina, USA)

8.2.2. Primery

Všechny použité primery pro přípravu knihoven kitem Advanta NGS Library Prep Reagent Kit byly navrženy a nasyntetizovány společností Fluidigm Ltd. Primery výrobce navrhl tak, aby pokrývaly všechny exony, 5´+3´-UTR oblasti genů *MC4R, POMC, SIM a BDNF,* vždy s přesahy do intronů minimálně 50pb.

8.3. Metody

8.3.1. Izolace DNA

U 55 vzorků, kde již chyběla DNA v DNA bance, byla ze zásobních zamražených plných nesrážlivých krví (EDTA) izolována genomická DNA. K izolaci byl použit přístroj QuickGene 610L (FujiFilm, Japonsko). Tato metoda izolace DNA je založena na principu vazby nukleových kyselin na molekuly SiO2 v přítomnosti chaotropních solí. Unikátní na použité technologii jsou kolonky, kde SiO2 tvoří porézní membránu. Tato technologie umožňuje získat DNA méně fragmentovanou a rovněž vysoké kvality. Lyzát plné krve je vzduchem prohnán přes SiO2 membránu kolonky a následně promýván pufrem s vysokým obsahem alkoholu. DNA je zachycena na membráně a molekuly, které nejsou žádoucí, jsou odstraněny. Posledním krokem izolace je uvolnění DNA z membrány pomocí elučního pufru (TE pufr).

U izolace se postupovalo dle standardního protokolu výrobce s použitím reagencií QuickGene DNA whole blood kitu.

Do zkumavky s 2ml nesražené krve bylo přidáno 300 µl EDB pufru a 250 µl lyzačního pufru (LDB). Zkumavka byla promíchána na vortexu a inkubována v lyzační peci 30 minut při 56°C. Následně bylo přidáno 2,5 ml 96% etanolu a znovu pečlivě promícháno na vortexu. Lyzát byl poté přemístěn do zásobníku přístroje QuickGene 610L a byl spuštěn program: DNA whole blood. Během tohoto programu došlo čtyřikrát k promývání vzorku pufrem s přidaným etanolem a konečné eluci prostřednictvím elučního pufru (CDB). Po izolaci byla zjištěna koncentrace výsledné DNA pomocí spektrofotometrického měření při vlnových délkách 260nm, 280nm a dalších pomocných délkách na UV spektrofotometru Qiaxpert (Qiagen, Německo). Postupovalo se dle návodu k přístroji, k měření se použily 2µl zvortexovaného eluátu. To umožnilo mimo koncentrace odhadnout i čistotu vzorku na základě poměru absorbancí DNA 260 nm/proteinů 280 nm a dalších pomocných vlnových délek (Kurabo Industries Ltd., 2022).

8.3.2. Fluorimetrické měření koncentrace DNA

Pro přípravu NGS knihoven je UV spektroskopické stanovení koncentrací DNA nedostatečně přesné, proto se všechny DNA musely přeměřit fluorimetricky. Měření koncentrace je založeno na detekování fluorescenčního barviva, které emituje záření pouze, pokud se naváže na specifické molekuly jako je ssDNA, dsDNA, RNA nebo protein, a to i při velice nízkých koncentracích. Pro každou z těchto molekul se používá specifické interkalační fluorescenční barvivo.

U měření koncentrace dsDNA fluorimetrem Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, USA) bylo postupováno dle protokolu s použitím reagencii Qubit dsDNA BR Assay Kit stejného výrobce, který je přesný pro měření koncentrace vzorků od 100 pg/µl do 1,000 ng/µl.

Nejprve byl připraven pracovní roztok, a to smícháním Qubit dsDNA BR pufru s Qubit dsDNA BR Reagent v poměru 1:200. Následně bylo 198 µl výsledného roztoku napipetováno automatickou pipetou do předpřipravených tenkostěnných plastových 0,5ml zkumavek. Do každé zkumavky bylo poté přidáno 2 µl měřené DNA.

Do zkumavek, které byly určeny pro standardy bylo napipetováno 190 µl roztoku a 10 µl Qubit standardu.

Všechny vzorky byly pečlivě zvortexovány a následně změřeny pomocí fluorimetru Qubit 2.0. DNA, které nedosahovaly požadované vstupní koncentrace pro přípravu DNA knihoven, byly koncentrovány odpařením na přístroji Digital Series SpeedVac Systems (Thermo Fisher Scientific, USA) a po zakoncentrování opět přeměřeny.

8.3.3. Příprava NGS knihoven

Pro přípravu genetických knihoven byla vybrána technologie, která umožnuje jejich rychlou a hospodárnou přípravu u velkého množství vzorků. Princip této technologie spočívá v použití tzv. Integrated fluidic circuits (IFC) firmy Fludigm (USA). Tato technologie používá velice malé objemy vzorků (0.03 µl) DNA a PCR reagencii, které jsou mikrofluidikou přeneseny do reakčních mikrocel v řádech nanolitrů krychlových, kde interagují a jsou střídáním teplot podrobeny amplifikaci (PCR reakcí). U vytváření knihoven bylo postupováno podle protokolu LP 192.24 IFC výrobce. Použitý typ tohoto array umožňoval přípravu 192 knihoven najednou. Primery byly rozděleny, dle kombinací stanovených výrobcem, do 24 reagenčních sad, a to kvůli prevenci nespecifických amplifikací. To znamená, že v rámci jednoho LP 192.24 IFC array probíhala příprava knihoven v 192*24 reagenčních mikrocelách (obr. 14 níže).

Nejprve byl připraven vzorkový pre-mix, a to smícháním následujících chemikálií do zkumavky o objemu 1,5 ml, viz tabulka 3.

Rozpis chemikálií pro jedno IFC	Množství µl
Voda pro PCR (PN 100-5941)	72
4xTSP Mastermix (PN 101-5786)	300
TSP sample loading reagent v2 (PN 101-7633)	60
TSP DNA Polymerase (PN 101-0995)	48

Tabulka 3.: Vzorkový pre-mix

Takto připravený pre-mix byl zvortexován, krátce stočen na mikrocentrifuze a následně napipetován do 8 jamkového stripu.

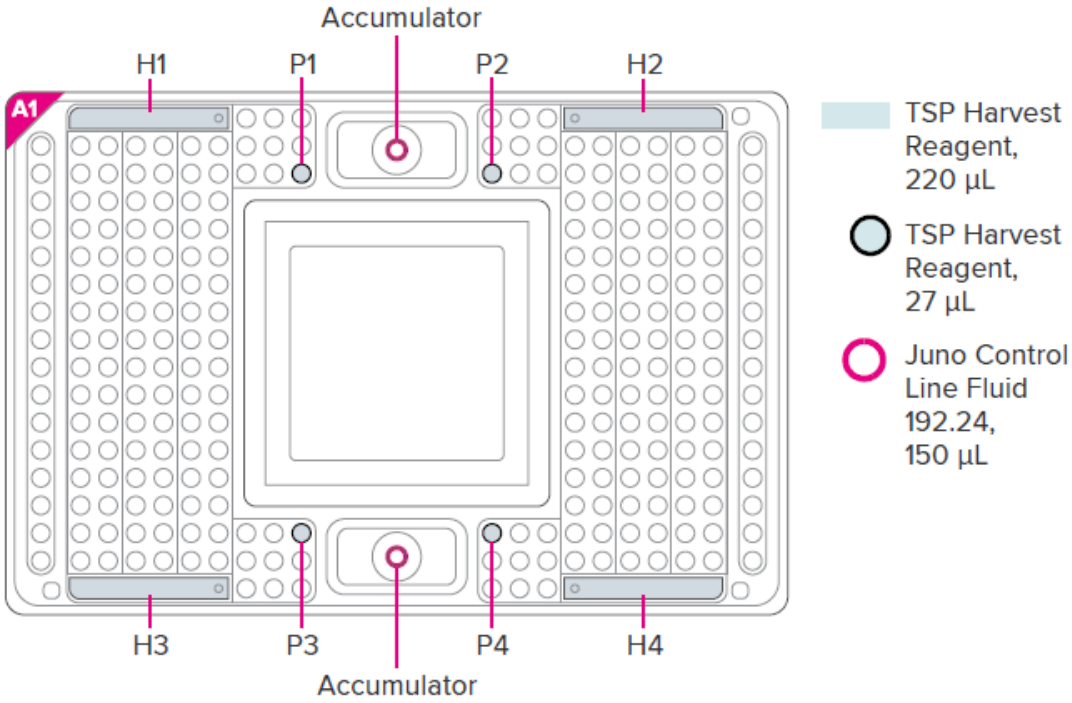
V dalším kroku byly do nové 96 jamkové destičky napipetovány následující objemy viz tabulka 4.

Rozpis chemikálií pro jedno IFC	Množství µl
Vzorkový pre-mix	2
Genomická DNA	2
Barkodovy primer z TSP Barcode Plate (Fluidigm PN 101-0744)	1

Tabulka 4.: Vzorkový mix

Pro každou DNA byl, pro odlišení jednotlivých knihoven, přidán unikátní barkodový primer. Celá destička byla následně důkladně zalepena lepivou folií, zvortexována a důkladně stočena na centrifuze.

Poté bylo připraveno samotné IFC a to následovně: do určených jamek byl vpraven LP 192.24 Control Line Fluid a 27µl a 220µl TSP Harvest Reagent viz obrázek 14.



Obrázek 14.: - Mapa IFC. Zdroj: https://www.fluidigm.com/

Následně bylo osmikanálovou pipetou do zbývajících jamek napipetováno 3,5µl připravených vzorků a primerů. Posledním krokem přípravy, bylo zakrytí jamek speciální folií LP 192.24 Barrier Tape.

Následovalo vložení IFC do přístroje JUNO (Fluidigm, USA) a vybrání programu One Step LP—192.24, který trval přibližně 5 hodin, a během kterých proběhla příprava 192 DNA knihoven. Po ukončení programu byla IFC vyjmuta z přístroje a vzorky okamžitě sesbírány do jedné 1,5ml plastové zkumavky.

8.3.4. Čištění NGS knihoven

Po přípravě knihoven přístrojem JUNO se všechny knihovny (192 vzorků) z IFC odpipetovaly a spojily do jedné zkumavky. Následně bylo nutné všechny shromážděné vzorky třikrát pročistit dle protokolu LP 192.24 IFC.

Pro pročištění byly použity magnetické kuličky Agencourt AMPure XP výrobce Beckman Coulter Life Sciences (USA).

Tyto magnetické kuličky jsou vyrobeny z malých částeček (od 20 do 30 nm) oxidů železitých, jako je magnetit (Fe_3O_4), které jim dávají magnetické vlastnosti, které jsou prokazovány pouze za přítomnosti externího magnetického pole. Tato vlastnost jim umožňuje se rozdělovat v suspenzi společně s čímkoli na nich navázaným, viz obrázek 15. Vlastní princip zachycení DNA na kuličce je na principu Solid Phase Reversible Immobilization (SPRI). Povrch magnetických kuliček obsahuje karboxylové skupiny, na které se v bezvodém prostředí reverzibilně váží DNA precipitované etanolem. K závěrečné eluci DNA z kuliček dochází v přítomnosti vody.

Obrázek 15.: Pročištění vzorků pomocí Agencourt AMPure XP. DNA fragmenty se váží k paramagnetickým kuličkám. V přítomnosti magnetického pole, se kuličky s navázaným DNA separují od nečistot. Následně se kuličky promývají etanolem a pomocí elučního pufru se DNA separuje od kuliček. Zdroj: https://www.mybeckman.cz/

8.3.5. Přidání adaptorů pro sekvenaci do pročištěné knihovny

Firma Fluidigm nabízí 384 kombinací barkodů pro označení jednotlivých knihoven. Jelikož celkový počet sekvenovaných vzorků byl 1920 (včetně 10 kontrol), musely se ke knihovnám přidat z druhé strany 4 různé sekvenční adaptory (barkody), čímž se získal dostatečný počet kombinací, umožňující mít pro každou sekvenovanou DNA unikátní kombinaci barkodů na obou stranách.

Po důkladném pročištění byly ke knihovnám přidány duální sekvenační adaptory, a to smícháním chemikálií rozepsaných v tabulce 5.

Rozpis chemikálií pro jednu knihovnu	Množství µl
4X TSP Master Mix (Fluidigm PN 101-5786)	7,5
TSP Adapter Mix	6,0
Pročištěná knihovna	4,5
PCR Voda (Fluidigm PN 100-5941)	12,0

Tabulka 5.: Reagencie pro přidání adaptorů

Takto připravený vzorek byl následně vložen do PCT cycleru (T100,Bio-Rad, USA), aby mohla proběhnout PCR viz tabulka 6.

Teplota C	Čas	Cykly
95	15 minut	1
95	15 sekund	10
60	90 sekund	
68	90 sekund	
68	3 minuty	1
4	Do odvolání	1

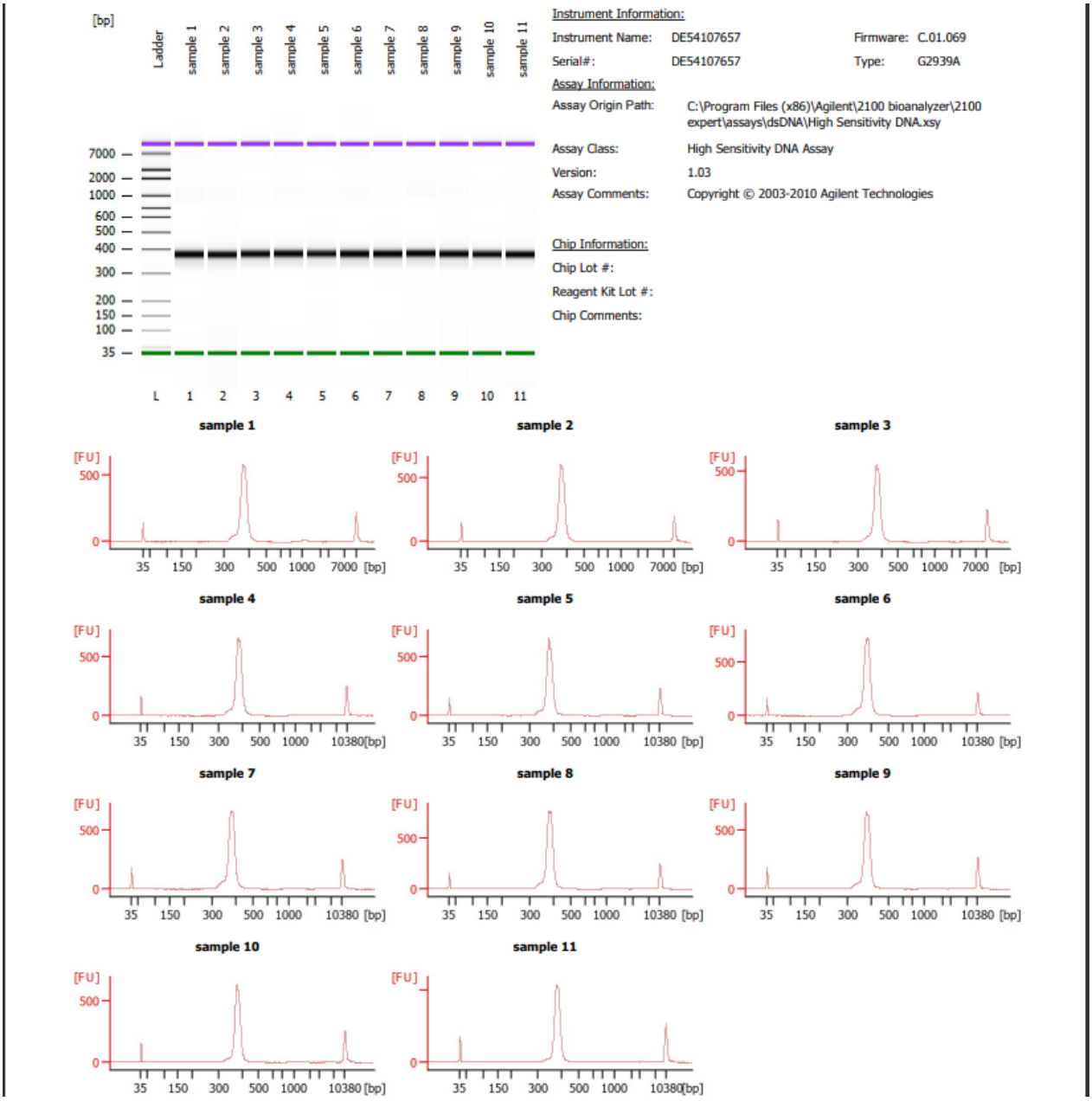
Tabulka 6.: Program pro PCR

Po doběhnutí PCR byly výsledné vzorky finálně pročištěny dle protokolu LP 192.24 IFC.

8.3.6. Zjištění kvality a koncentrace připravených NGS knihoven

Kvalita připravených knihoven byla následně analyzována na automatické kapilární elektroforéze - 2100 Bioanalyzer (Aqilent, USA) s použitím Agilent High Sensitivity DNA chipu (Agilent,USA). Bioanalyzér pracuje na principu kapilární elektroforézy v čipovém uspořádání s minimální spotřebou vzorku a umožňuje nahrazení všech kroků

klasické elektroforézy jako tvorba gelu, barvení, odbarvování, detekce bandů a zobrazení. Knihovny byly 10x a 100x naředěny vodou pro injekční účely viz obrázek 16.



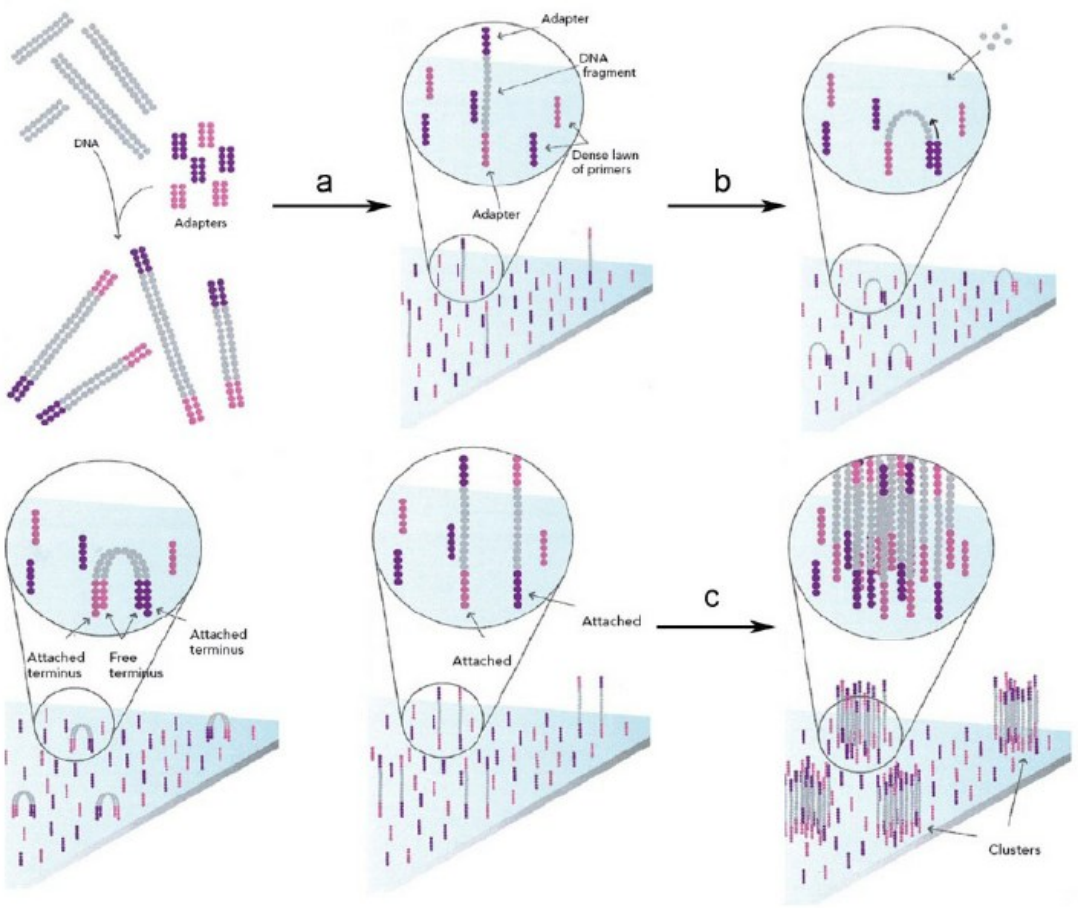
Obrázek 16.: Výstupy z Bioanalyzéru. V horní části obrázku jsou jednotlivé výstupy měření připravených knihoven převedeny virtuálně softwarem přístroje do podoby klasického elektroforeogramu vertikální akrylamidové elektroforézy. Spodní část obrázku obsahuje elektroforeogramy jednotlivých knihoven (prostřední píky). Každý elektroforeogram začíná a končí přidanými markry, které umožňují softwaru vyrovnat rozdíly v elektroforetické mobilitě jednotlivých měření a kvantifikovat množství knihoven. Odečet velikostí se provádí vůči žebříčku velikostních markerů 100-7000pb (elektroforeogram žebříčku není zobrazen).

8.3.7. Sekvenace

Takto připravené vzorky, byly poté zaslány do Ústavu molekulární genetiky na sekvenaci na přístroji NextSeq 500 (Illumina, USA). Vzorky byly z důvodu kapacity rozděleny do tří sekvenačních běhů přístroje. Pro sekvenaci byl použity sekvenanční reagencie a komponenty NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2 (Illumina, USA).

Sekvenace DNA je proces, který stanovuje sekvenci nukleotidů v řetězci DNA. V prvním kroku jsou DNA řetězce denaturovány do jednořetězcového stavu. Po této přípravě jsou DNA fragmenty vpraveny do rekčních komůrek (flowcells), kde se komplementární část DNA naváže na primery (adaptory) na povrchu skel reakčních komůrek. Přichycená DNA se následně replikuje (tzv. klonální PCR) a vytváří malé shluky DNA (klastry) o stejné sekvenci viz obrázek 17.

Sekvenátor, v cyklicky opakujících se krocích, přidává nezbytné reagencia pro sekvenační reakci. Jsou přidány sekvenační primery, které přisedají ke specifickým sekvencím na začátku knihoven a polymeráza následně postupně přidává fluorescentně značené nukleotidy s inaktivovanou 3´-OH skupinou (terminační značka). To zajišťuje inkorporaci právě jednoho nukleotidu v jednom cyklu. Po začlenění je zachycen signál detektorem a terminační značka je z nukleotidu odstraněna a je začleněn další nukleotid (Koubková et al., 2014).



Obrázek 17.: Sekvenování nové generace. Vytváření shluků mostovou amplifikací. (a)Náhodně fragmentovaná genomová DNA je připojena na adaptory. Jedno vláknové fragmenty jsou vázány do vnitřku průtokových komůrek. (b) Neoznačené nukleotidy a enzymy jsou přidány, aby zahájily pevnou fázi mostové amplifikace. Poté jsou vytvořeny dvoj-vláknové templáty. (c) Dvoj-vláknové templáty jsou denaturovány do jedno vláknové podoby. Denaturace a extenze jsou opakovány a výsledkem je lokalizovaná amplifikace jedné molekuly napříč povrchem průtokové komůrky tzv. Flow cell (Wilantho et al., 2012).

8.3.8. Analýza sekvencí

Pro analýzu z NGS sekvenační platformy NextSeq byl použit program FinalistDX (Institute of Applied Biotechnologies, a.s., Česká republika), který umožňuje komplexní bioinformatickou analýzu od FASTQ souborů, které generoval sekvenátor NextSeq. Dalšími postupnými kroky analýzy byla kontrola kvality, zarovnání k referenčnímu genomu hg38, analýzu pokrytí i tzv. variant calling (volání variant) což je postup, kterým se identifikují varianty ze sekvenčních dat, které nejsou uvedeny v referenčním genomu. Pro analýzu byla použita výchozí nastavení pro vyhodnocování sekvenačních dat zárodečného genomu. Použitá technologie příprav knihoven neumožňuje analýzu větší Inzerčních/Delečních variant tzv. CNVs analýzu (copy number variations).

8.3.9. Hodnocení variant

Nalezené varianty byly následně hodnoceny za použití databází, predikčních programů a literatury. Kauzální varianty byly zjišťovány v databázích pomocí on-line nástroje Varsome (dostupné na https://www.varsome.com/) a v řadě veřejně dostupných databází, např. z National Library of Medicine nebo National Institutes of Health, USA (dostupné na https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) PubMed, ClinVar, dbSNP, dbGaP a dalších.

Výsledek ze sumarizačního nástroje Varsome zahrnoval podrobnosti o variantě jako je její pozice, referenční i alternativní sekvence a typ. Dále výsledek zahrnoval ACMG klasifikace, populační frekvence a sumarizaci in silico hodnocení patogenity z řady algoritmů. Pokud byla varianta již dříve popsána, byly uvedeny i odkazy na příslušné publikace.

8.3.10. Predikční algoritmy

I. PolyPhen

PolyPhen nebo Polymorfní fenotypizace je nástroj, který předvídá vliv aminokyselinové substituce na strukturu a funkci proteinu (dostupný na adrese http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/). Používá přímé fyzické a srovnávací posouzení. Je zásadní složkou posuzování velkých data setů vzácných genetických variant viz tabulka 7.

Je používán k identifikaci vzácných alel způsobujících mendelovsky děděná onemocnění, vyhledávání potenciálně lékařsky použitelných alel v individuálních genomech a k profilování vzácných variant objevených celogenomovými sekvenacemi (Adzhubei et al., 2013).

Hodnota PolyPhen	**Kvalitativní predikce**
větší než 0,908	pravděpodobně škodlivé
větší než 0,446 a pod nebo rovno 0,908	možná škodlivé
pod nebo rovno 0,446	benigní

Tabulka 7.: Hodnota a predikce nástroje PolyPhen

II. SIFT

Nástroj SIFT (dostupný na adrese http://sift-dna.org) předvídá, zda aminokyselinová substituce ovlivní proteinovou funkci na základě sekvenční homologie a fyzicko-chemické podobnosti mezi alternativním aminokyselinami. Výstupem pro každou aminokyselinovou substituci je skóre a kvalitativní predikce (tolerované, škodlivé) viz tabulka 8. (Vaser et al., 2016).

Hodnota SIFT	**Kvalitativní predikce**
pod 0,05	škodlivé
větší nebo roven 0,05	tolerované

Tabulka 8.: Hodnota a predikce nástroje SIFT

III. MutationTaster

MutationTaster hodnotí varianty pro jejich potenciál způsobovat nemoci. Software uskutečňuje in sillico testy, aby odhadl vliv varianty na protein (dostupný na adrese http://www.mutationtaster.org). Není limitován pouze na substituce jedné aminokyseliny, ale zvládne i synonymní varianty a varianty v intronových oblastech (Schwarz et al., 2010).

IV. CADD a DANN

CADD (Combined Annotation Dependent Depletion) je nástroj pro vyhodnocování škodlivosti, a to jak jedno-nukleotidových variant, tak i insercí a delecí v lidském genomu. Integruje více anotací do jedné porovnáváním variant, které byly zachovány přírodním výběrem, se simulovanými mutacemi (dostupný na adrese https://cadd.gs.washington.edu/score).

C-skóre silně koreluje s alelickou diverzitou, patogenitou kódujících i nekódujících variant; hodnotí také kauzální varianty vně jednotlivých genomických sekvencí (Kircher et al. 2014).

DANN je funkční predikční nástroj založený na hluboké neurální síti (Deep Neural Network). Hodnota může být v rozmezí 0 až 1, kdy vyšší hodnoty spíše znamenají vyšší škodlivost (Quang et al., 2015). DANN používá stejný výcvik a anotační data jako CADD, ale používá jiné nelineární strojové učení (Jensen, 2015).

9. Výsledky

Celkově bylo sekvenováno 1910 nepříbuzných dětí a adolescentů ze čtyř kohort pro geny *MC4R, POMC, SIM1 a BDNF*. U 7 DNA se nepodařilo získat sekvenační data. Důvodem mohla být špatná kvalita genomické DNA nebo chyba v mikrofluidice při přípravě knihoven. Bohužel již nebyla možnost u těchto vzorků sekvenaci zopakovat, jelikož přístroj na přípravu knihoven byl zapůjčen výrobcem pouze na omezenou dobu. Ze všech objevených variant byly vyselektovány pouze ty s frekvencí minoritní alely (MAF) ≤ 1 % a výskytem varianty v sekvenačních readech odpovídající zárodečné variantě, tj. s výskytem> 30 % readů.

Mezi probandy bylo nalezeno 20 variant, které byly poté interpretovány dle směrnic Amerického kolegia lékařské genetiky (ACMG) a splňovaly požadavky pro patogenní nebo pravděpodobně patogenní varianty. Všechny vybrané nalezené varianty byly heterozygotní viz tabulka 9. V nejmenším souboru vzorků zaslaných z Fakultní nemocnice Olomouc (n=47) nebyly nalezeny žádné kauzální varianty ve vyšetřovaných genech. Také u žádného z 1903 vzorků nebyly nalezeny žádné kauzální varianty způsobující monogenní obezitu v genu BDNF.

V této práci uvedené pozice kódujících sekvencí a pozice aminokyselin vycházejí z referenčních sekvencí: NM_005912.3 (gen MC4R), NM_000939.4 (gen POMC), NM_005068.3 (gen SIM1).

Proband	Gen	Genotyp	Protein	rs(dbSNP)	Důsledek	Varianta	Fenotyp
I01-65	MC4R	Heterozygot	p.Leu211MetfsTer6	rs13447338	Posun čtecího rámce	delece	Nadváha
OMK1421_S347_ME	MC4R	Heterozygot	I185F (p.Ile185Phe)	Neuvedena	Missense varianta	SNV	Obezita
I13-01_S228_ME	MC4R	Heterozygot	G181D p.Gly181Asp)	rs13447333	Missense varianta	SNV	Obezita
I04-21_S273_ME	MC4R	Heterozygot	V166I (p.Val166Ile)	rs942758928	Missense varianta	SNV	Obezita
OMK1466_S288_ME	MC4R	Heterozygot	R165W(p.Arg165Trp)	rs13447332	Missense varianta	SNV	Obezita
OMK1561_S311_ME	MC4R	Heterozygot	S139R (p.Ser139Arg)	rs551371840	Missense varianta	SNV	Obezita
OMK1560_S484_ME	MC4R	Heterozygot	S139R (p.Ser139Arg)	rs551371840	Missense varianta	SNV	Obezita
OMK1571_S353_ME	MC4R	Heterozygot	L54P (p.Leu54Pro)	rs376439188	Missense varianta	SNV	Morbidní obezita
E45-03_S591_ME	MC4R	Heterozygot	F51L (p.Phe51Leu)	rs147000967	Missense varianta	SNV	Nadváha
E36-18_S144_ME	MC4R	Heterozygot	F51L (p.Phe51Leu)	rs147000967	Missense varianta	SNV	Nadváha

Tabulka 9.: Nalezené varianty u genu MC4R. Použita referenční sekvence NM_005912.3(MC4R)

I13-38_S28_ME	POMC	Heterozygot	R154G (p.Arg154Gly)	Neuvedena	Missense varianta	SNV	Nadváha
OMK1522_S548_ME	POMC	Heterozygot	P59L(p.Pro59Leu)	rs752644128	Missense varianta	SNV	Obezita
E24-13_S707_ME	POMC	Heterozygot	P59L(p.Pro59Leu)	rs752644128	Missense varianta	SNV	Nadváha
E15-24_S377_ME	POMC	Heterozygot	P59L(p.Pro59Leu)	rs752644128	Missense varianta	SNV	Normální váha
E27-14_S755_ME	POMC	Heterozygot	P59L(p.Pro59Leu)	rs752644128	Missense varianta	SNV	Obezita
I12-26_S544_ME	POMC	Heterozygot	P59L(p.Pro59Leu)	rs752644128	Missense varianta	SNV	Nadváha
I02-134_S155_ME	POMC	Heterozygot	P59L(p.Pro59Leu)	rs752644128	Missense varianta	SNV	Nadváha/obezita

Tabulka 10.: Nalezené varianty u genu POMC. Použita referenční sekvence NM_000939.4 (POMC)

OMK1517_S476_ME	SIM1	Heterozygot	Q116* (p.Gln116Ter)	neuvedena	Varianta střihového místa, Stop varianta	SNV	Obezita
I01-01_S455_ME	SIM1	Heterozygot	H83Y (p.His83Tyr)	rs1351901140	Missense varianta	SNV	Morbidní obezita
OMK1523_S252_ME	SIM1	Heterozygot	H83Y (p.His83Tyr)	rs1351901140	Missence varianta	SNV	Nadváha

Tabulka 11.: Nalezené varianty u genu SIM1. Použita referenční sekvence NM_005068.3(SIM1)

Proband	Věk	z-BMI	Pohlaví
I01-65	14	2,44	muž
OMK1421_S347_ME	10	5,18	žena
I13-01_S228_ME	11	2,15	žena
I04-21_S273_ME	14	2,39	žena
OMK1466_S288_ME	9	3,01	žena
OMK1561_S311_ME	9,5	2,27	žena
OMK1560_S484_ME	14	3,13	žena
OMK1571_S353_ME	12	4,01	žena
E45-03_S591_ME	17	1,34	žena
E36-18_S144_ME	17	1,34	žena
I13-38_S28_ME	10	1,9	žena
OMK1522_S548_ME	14	Neuvedeno	žena
E24-13_S707_ME	16	1	muž
E15-24_S377_ME	16	0,54	žena
E27-14_S755_ME	17	2,31	muž
I12-26_S544_ME	14	1,9	muž
I02-134_S155_ME	12	2,5	žena
OMK1517_S476_ME	14	3,71	žena
I01-01_S455_ME	15	2,07	žena
OMK1523_S252_ME	22	4,11	muž

Tabulka 12.: Věk, pohlaví a z-BMI u probandů s nalezenou mutací

Gen	Pozice v genomu	WT alela	MUT alela	dbSNP	Frekvence (gnomAD)
MC4R	chr18:60371715	TAGAG	T	rs13447338	delGAGA=0.00003
MC4R	chr18:60371797	T	A	Neznámé	Neznámá
MC4R	chr18:60371808	C	T	rs13447333	T=0.000030
MC4R	chr18:60371854	C	T	rs942758928	T=0.000007
MC4R	chr18:60371857	G	A	rs13447332	A=0.000015
MC4R	chr18:60371933	G	C	rs551371840	C=0.000000
MC4R	chr18:60372189	A	G	rs376439188	G=0.000000
MC4R	chr18:60372199	A	G	rs147000967	G=0.000000
POMC	chr2:25161425	G	C	Neznámé	Neznámá
POMC	chr2:25161709	G	A	rs752644128	A=0.00008
SIM1	chr6:100450269	G	A	Neznámé	Neznámá
SIM1	chr6:100453773	G	A	rs1351901140	A=0.000022

Tabulka 13.: Přehled nalezených mutací s jejich výskytem frekvence v rozsáhlé populační databázi Genome Aggregation Database (gnomAD v2.1.1, dostupné na https://gnomad.broadinstitute.org) Pozice mutace je vztažena k referenční sekvenci lidského genomu GRCh38/hg38. Číslo rs bylo přiřazeno z databáze Single Nucleotide Polymorphism Database(dbSNP) of nucleotide sequence variation (dostupné na https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp)

Gen	Protein	SIFT	Polyphen Skore	PolyPhen	PhyloP100way	DANN	Mutation Taster
MC4R	p.Leu211MetfsTer6	X	X	X	9,325	X	X
MC4R	I185F (p.Ile185Phe)	škodlivé	1	pravděpodobně škodlivé	8.017	0.9882	Způsobující onemocnění
MC4R	G181D p.Gly181Asp)	škodlivé	1	pravděpodobně škodlivé	7.905	0.9976	Způsobující onemocnění
MC4R	V166I (p.Val166Ile)	škodlivé	0,281	benigní	6.118	0,9973	Způsobující onemocnění
MC4R	R165W(p.Arg165Trp)	škodlivé	0,99	pravděpodobně škodlivé	2.676	0.9992	Způsobující onemocnění
MC4R	S139R (p.Ser139Arg)	tolerované	0,987	pravděpodobně škodlivé	3.555	0.9978	Způsobující onemocnění
MC4R	L54P (p.Leu54Pro)	škodlivé	1	pravděpodobně škodlivé	9.325	0.9989	Způsobující onemocnění
MC4R	F51L (p.Phe51Leu)	škodlivé	0,905	pravděpodobně škodlivé	9.325	0.9990	Způsobující onemocnění
POMC	R154G (p.Arg154Gly)	škodlivé	0,998	pravděpodobně škodlivé	3.335	0.9986	Způsobující onemocnění
POMC	P59L(p.Pro59Leu)	škodlivé	0,312	benigní	5.124	0.9978	Způsobující onemocnění
SIM1	Q116* (p.Gln116Ter)	X	X	X	9.602	0.9985	Způsobující onemocnění
SIM1	H83Y (p.His83Tyr)	tolerované	0,05	benigní	9.564	0.9980	Způsobující onemocnění

Tabulka 14.: Výsledky z predikčních algoritmů u nalezených mutací.

Soubor (počet)	*MC4R*	*POMC*	*SIM1*	*BDNF*
COPAT Intervence	3	3	1	0
COPAT Epidemiologie	2	3	0	0
Pacienti indikovaní k vyšetření monogenní obezity	5	1	2	0
Extrémně obézní pacienti zaslaní z FN Olomouc	0	0	0	0

Tabulka 15.: Rozložení výskytu jednotlivých mutací napříč soubory

COPAT Epidemiologie celkem	*MC4R*	*POMC*	*SIM1*
978	2	3	0
frekvence (%)	0,204	0,306	0

Tabulka 16.: Frekvence variant v souboru COPAT Epidemiologie

COPAT Intervence celkem	*MC4R*	*POMC*	*SIM1*
679	3	3	1
frekvence (%)	0,441	0,441	0,147

Tabulka 17.: Frekvence variant v souboru COPAT Intervence

Pacienti indikovaní k vyšetření monogenní obezity	*MC4R*	*POMC*	*SIM1*
199	5	1	2
frekvence (%)	2,512	0,502	1,005

Tabulka 18.: Frekvence variant v souboru pacientů indikovaných k vyšetření monogenní obezity v Endokrinologickém ústavu

10.Diskuse

Současné studie naznačují, že genetické faktory hrají důležitou roli v determinaci prevalence obezity uvnitř populace. Jen relativně malý počet genů je zapojen do hlavní osy regulující energetickou homeostázi, nicméně mnohem více genů s minoritními efekty může zprostředkovávat expresi obezity ve vhodném prostředí pomocí vzájemných doposud nepopsaných interakcí.

V rámci toho není role MC4R, ač nesporně důležitá, stále plně objasněna. Studie jasně prokázaly spojitost mezi obezitou a mutací v MC4R (Aykut et al., 2020), kdy se prevalence pohybovala mezi 0,5 až 5,8 %. Toto rozpětí se dá vysvětlit jiným etnickým složením populace, nebo spíše různými kritérii pro výběr pacientů, jako je rozsah BMI, věk nástupu obezity či věk při začátku studie nebo komorbidity.

V britské studii s prevalencí mutací *MC4R* 5,8 (Farooqi et al., 2009) vybírali pouze děti s časným nástupem morbidní obezity; naopak v dánské studii vybírali i pacienty s nadváhou (van den Berg et al., 2011). Tyto rozdíly mohou ovlivnit hodnocení pravé prevalence mutací v genech zapojených do signalizační kaskády MC4R v populaci.

V naší studii bylo mezi 1903 českými dětmi nalezeno 8 již dříve popsaných mutací v genu *MC4R*, a to Leu211MetfsTer6, Ile185Phe, Gly181Asp, Val166Ile, Leu54Pro, Ser139Arg, Phe51Leu a Arg165Trp. Popsané mutace zahrnovaly 7 missense mutací a jednu variantu posunu čtecího rámce. Všechny zjištěné varianty byly heterozygotní.

Varianta Leu211MetfsTer6 je variantou posunu čtecího rámce, která se se nachází ve vysoce konzervované oblasti (phyloP100way=10). Vede k posunu čtecího rámce a vzniku pěti abnormálních aminokyselin a vzniku předčasného stop kodonu v oblasti páté transmembrální domény, což označuje zkrácený, a tím pádem i méně funkční, *MC4R* (Lee et al., 2008). Nosičem této varianty je 14letý chlapec, který podstoupil ozdravný léčebný pobyt v lázních, kdy na začátku léčby bylo jeho z-BMI 2,44 a po skončení léčby 2,09.

Missense varianta Ile185Phe se nacházela u 10leté dívky s z-BMI 5,18 a neustálým hladem, kdy ani jeden z rodičů neměl BMI mimo normu. CAD skóre bylo stanoveno na 27, což označuje variantu méně stabilizovanou selekcí, a tím pádem způsobující nemoc častěji, nežli je náhoda. Varianta Ile185Phe již v minulosti byla popsána u obézních

pacientů a vykazuje sníženou aktivitu cAMP, a s tím asociovanou ztrátou funkce *MC4R* (Bonnefond et al., 2016).

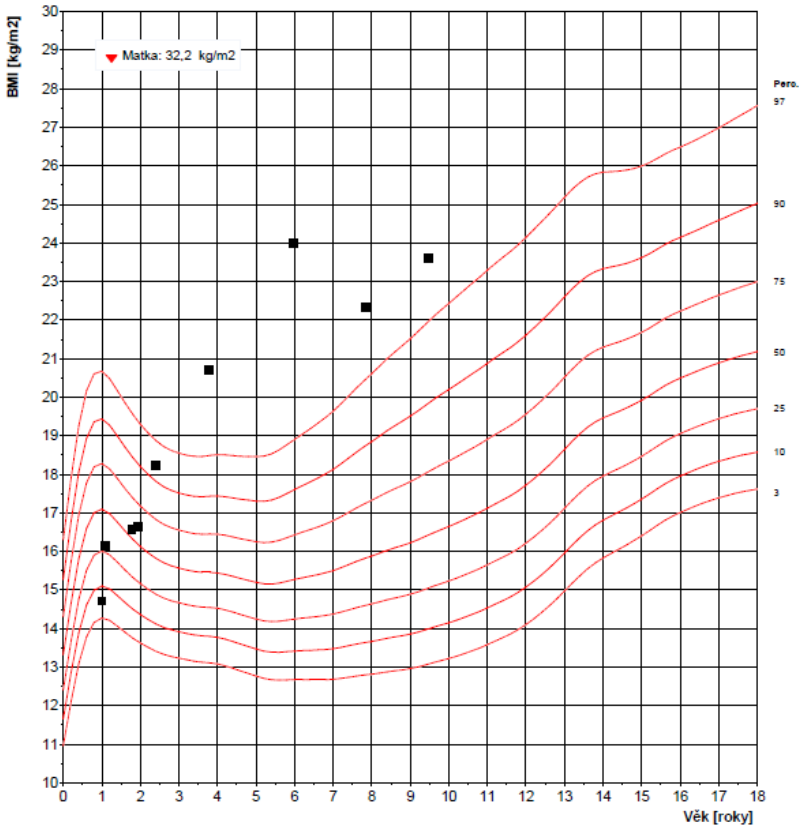
Gly181Asp je popsána v několika studiích jako varianta s úplnou ztrátou funkce. Ve funkční studii se tato varianta nevázala na radiově značené ^{125}I-NDP-MSH, což naznačuje, že exprimuje málo správně složeného receptoru na povrchu buňky, nebo že aminokyselinová změna v receptoru změnila schopnost vázat se na ^{125}I-NDP-MSH (syntetický peptidový ligand). Studie také naznačují, že hladina povrchové exprese je v porovnání se standardní alelou dramaticky snížená (Xiang et al., 2010). Gly181Asp bylo nalezeno u 11leté dívky s z-BMI 2,15. Tato dívka byla zahrnuta v souboru COPAT Intervence, což znamená, že podstoupila lázeňsky redukční pobyt.

Exprese Val166Ile v savčích buňkách ukázala, že množství mutantního receptoru na povrchu je výrazně sníženo oproti standardní alele (WT), ale zároveň vykazuje nižší EC50 při aktivaci αMSH než WT a má sníženou inhibici agonistou AGRP v porovnání s WT. Toto naznačuje, že Val166Ile způsobuje hyperaktivní signalizaci sytosti způsobenou αMSH, zatímco neefektivní AGRP inhibice nespustí příjem potravy. Jelikož je tato mutace nacházena u morbidně obézních jedinců, je složité určit, jaká je rovnováha mezi nízkou expresí na povrchu buňky a zvýšenou aktivitou receptoru (Rovite et al., 2014). V naší studii byla varianta Val166Ile nalezena u 14leté dívky s z-skóre 2,39. Tato dívka taktéž podstoupila léčebný redukční pobyt lázních a její z-BMI po 6 měsících od ukončení léčebného pobytu kleslo na 2,33. Hmotnostně probandka zhubla ze 100,3 kg na 99,2 kg. Studie zkoumající vliv změny životního stylu po dobu jednoho roku u dětí s mutacemi v *MC4R* dospěla k závěru, že ačkoli účastnící byli schopni snížit svou hmotnost, tak po roku od této změny životního stylu děti s *MC4R* mutacemi vykazovaly podobné hodnoty jako před intervencí. To znamená, že nositelé variant v *MC4R* jsou schopni dosáhnout snížení hmotnosti, avšak již nikoliv dlouhodobě si sníženou hmotnost udržet (Reinehr et al., 2009).

Varianta Leu54Pro byla nalezena u 12leté dívky s z-BMI 4,01. Hodnota BMI u obou jejich rodičů překračuje 30 kg/m^2, nicméně rodiče nebyli podrobení genetické analýze, pročež není zřejmé, zdali jsou nositeli této mutace. Tato mutantní varianta vykazuje zhoršenou funkci transportu na buněčném povrchu, sníženou schopnost vázat se na radioligandy NDP-MSH a redukovanou schopnost generovat cAMP jako odpověď na navázání se ligandu. Celková exprese, která je složená z receptorů na povrchu i vně

buňky, byla značně narušená. Tato mutace je pravděpodobně spojená se změnou struktury v horní třetině 1.transmembrální domény (TM1). Tato změna ve skládání helixů může snížit strukturální stabilitu kódovaného receptoru (Tan et al., 2009).

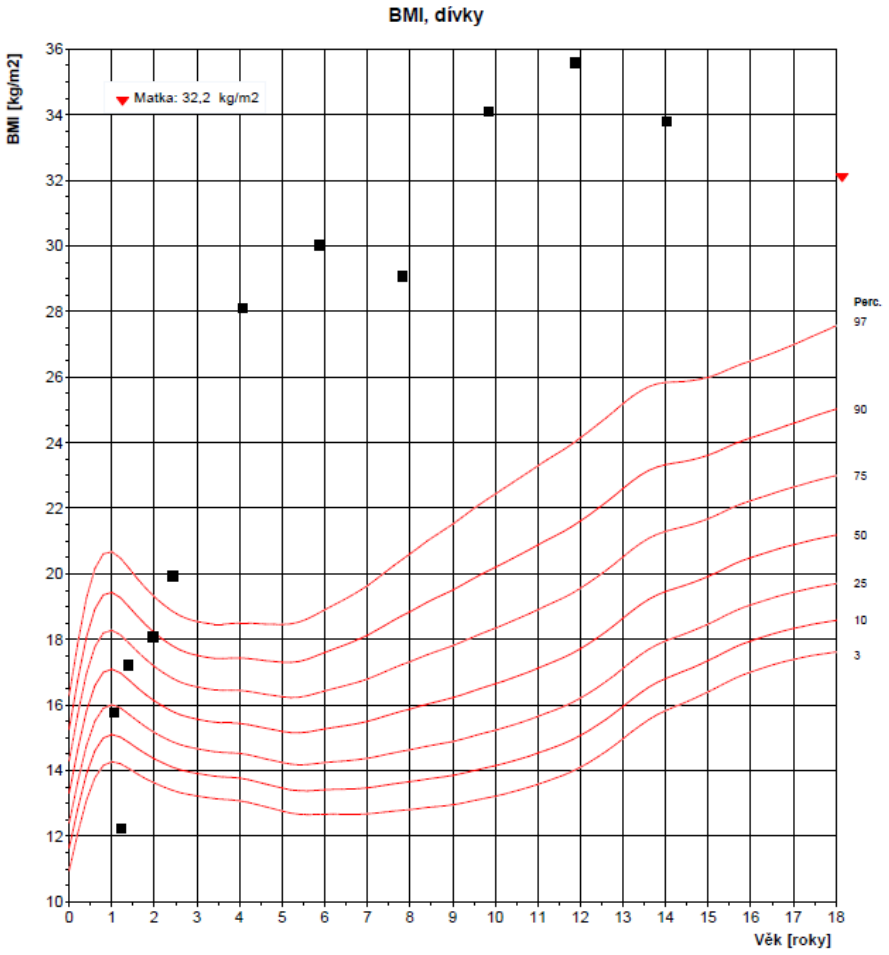
Varianta Ser139Arg je velice málo popsaná varianta, kdy je zmíněna pouze v několika málo pracích, avšak tato varianta má patrně za následek úplnou ztrátu funkce receptoru a porušený membránový transport (Tarnow et al., 2008). Byla nalezena u dvou sester s BMI nad 97. percentilem. U starší, tehdy 14leté, trvá dle antropometrických dat obezita od 1,5 roku viz obrázek 19.; u mladší, tehdy 9leté, trvá dle antropometrických dat obezita od 3 let viz obrázek 18. BMI matky bylo v době měření 35 kg/m^2 a u otce BMI není známo. Zajímavé je, že u těchto sester byly nalezeny rovněž další mutace, nicméně všechny byly intronové varianty klasifikovány jako pravděpodobně benigní, nebo varianty s nejasným významem. I přes to nemůžeme plně vyloučit kumulativní efekt, těchto mutací.



Tabulka dat:

Věk [roky]	BMI [kg/m2]	Percentil [%]	Z skóre [1]	Výškový věk [roky]	Perc. na VV [%]	Z skóre na VV [1]
1,0	14,7	6	-1,56	0,2	58	0,21
1,1	16,1	28	-0,57	0,2	81	0,87
1,8	16,6	56	0,16	0,9	38	-0,30
1,9	16,7	62	0,31	1,2	42	-0,19
2,4	18,2	94	1,52	1,7	86	1,10
3,8	20,7	100	2,99	4,0	100	2,97
6,0	24,0	100	3,71	6,6	100	3,40
7,9	22,3	99	2,43	8,9	98	2,12
9.5	23.6	99	2.27	10.9	98	1.97

Obrázek 18.: Percentilový BMI graf dle věku dívky OMK1561(MC4R, p.Ser139Arg) od 1 roku do 9,5 roku. Zpracováno programem RustCZ (Státní zdravotní ústav).



Tabulka dat:

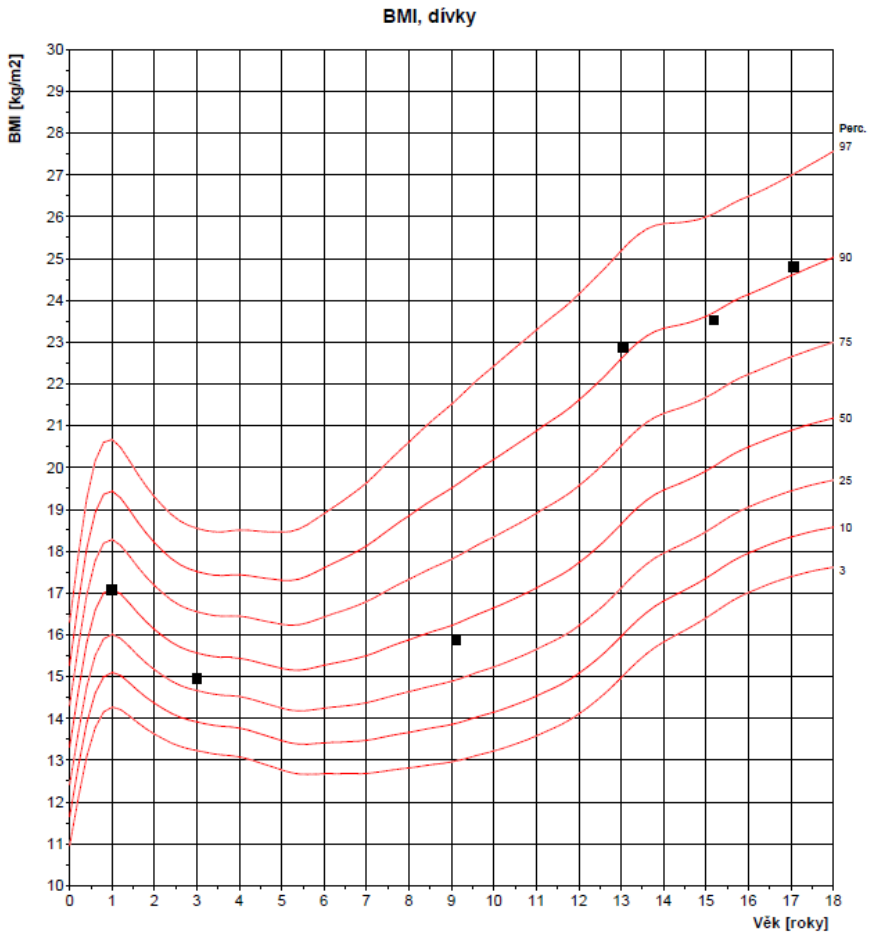
Věk [roky]	BMI [kg/m2]	Percentil [%]	Z skóre [1]	Výškový věk [roky]	Perc. na VV [%]	Z skóre na VV [1]
1,1	15,8	21	-0,81	0,1	88	1,18
1,2	12,3	0	-3,52	0,5	0	-2,90
1,4	17,2	61	0,27	0,4	81	0,89
2,0	18,1	88	1,19	1,2	74	0,65
2,4	19,9	99	2,45	1,8	98	2,07
4,1	28,1	100	5,59	4,1	100	5,58
5,9	30,0	100	5,23	6,0	100	5,16
7,8	29,1	100	3,90	8,7	100	3,52
9,9	34,1	100	3,78	11,0	100	3,49
11,9	35,6	100	3,49	13,0	100	3,34
14,0	33,8	100	3,13	14,6	100	3,16

Obrázek 19.:Percentilový BMI graf dle věku dívky OMK 1560 MC4R, p.Ser139Arg od 1 roku do 14 let. Zpracováno programem RustCZ (Státní zdravotní ústav).

Phe51Leu je málo popsaná varianta, které se nicméně našla u obézních jedinců (Branson et al., 2003; Stutzmann et al., 2008). Tato varianta mění aminokyselinový sled a v této studii byla zaznamenána u dvou dívek ve věku 17 let z epidemiologické části studie COPAT. Jak je vidět z grafů viz obrázky 20. a 21., ani jedna z dívek netrpí extrémní obezitou, nicméně jejich BMI je mezi 90. a 97. percentilem.

Na základě skutečnosti, že se tato mutace nachází ve vysoce konzervované oblasti (phyloP100way=9.32), a na základě in silico predikcí a fenotypového obrazu

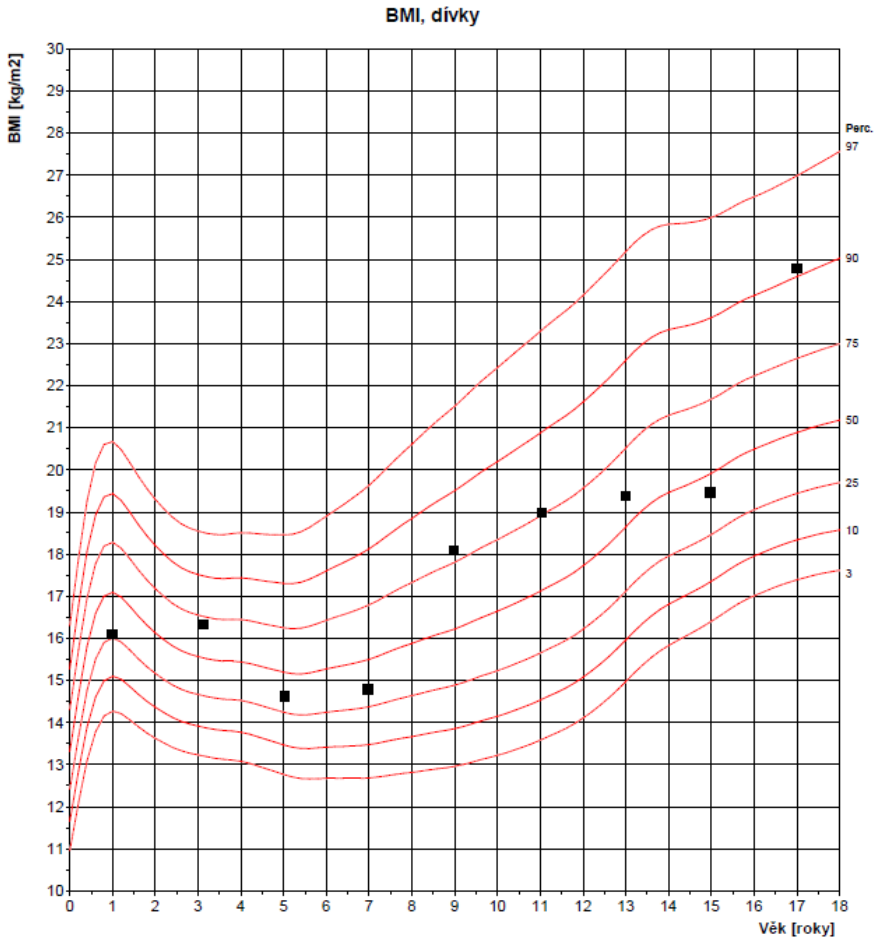
probandek, je možno předpokládat, že tato varianta je nejspíše patogenní a přispívá k vyšší hmotnosti.



Tabulka dat:

Věk [roky]	BMI [kg/m2]	Percentil [%]	Z skóre [1]	Výškový věk [roky]	Perc. na VV [%]	Z skóre na VV [1]
1,0	17,1	50	-0,01	0,9	51	0,02
3,0	15,0	33	-0,45	2,8	31	-0,49
9,1	15,9	43	-0,18	7,2	56	0,16
13,1	22,9	91	1,34	12,3	94	1,53
15,2	23,5	89	1,23	13,2	93	1,46
17,1	24,8	91	1,33	13,6	95	1,68

Obrázek 20.: Percentilový BMI graf dle věku dívky (E45-03) MC4R p.Phe51Leu*. Zpracováno programem RustCZ (Státní zdravotní ústav).*



Tabulka dat:

Věk [roky]	BMI [kg/m2]	Percentil [%]	Z skóre [1]	Výškový věk [roky]	Perc. na VV [%]	Z skóre na VV [1]
1,0	16,1	27	-0,61	1,1	27	-0,60
3,1	16,3	71	0,55	3,3	72	0,57
5,0	14,6	35	-0,39	5,4	36	-0,36
7,0	14,8	34	-0,41	8,0	28	-0,58
9,0	18,1	79	0,79	10,3	70	0,53
11,0	19,0	76	0,69	11,9	69	0,50
13,0	19,4	61	0,28	---	---	---
15,0	19,5	42	-0,19	---	---	---
17,0	24,8	91	1,34	---	---	---

Obrázek 21.: Percentilový BMI graf dle věku dívky (E36-18) MC4R ***p.Phe51Leu****. Zpracováno programem RustCZ (Státní zdravotní ústav).*

Varianta Arg165Trp byla pozorována u 9leté dívky s z-BMI 3,01. U této pacientky byla také zjištěna mentální retardace, vývojová dysfázie a neurologicko-psychické problémy. Tato mutace již byla popsána u obézního adolescenta (Hinney et al., 1999). Společně se vyskytující obezita a intelektuální postižení je spíše typická pro takzvanou syndromovou obezitu nežli pro obezitu monogenní, nicméně souvislost nelze plně vyloučit.

Gen *POMC* kóduje prekurzor, který následně prochází rozsáhlými tkáňově specifickými post-translačními úpravami. *POMC* protein může být následně štěpen na 7 peptidů, adrenokortikotropní hormon, α-MSH, β-MSH, γ-MSH a další.

Nová varianta byla nalezena u genu *POMC*, a to Arg154Gly. Tato varianta se nenachází v konzervované oblasti (phyloP100way = 3.34), nicméně in silico predikce v tomto případě variantu označily jako patogenní ve 12 případech. Nositelkou této heterogenní varianty je 10letá dívka s BMI-SDS skoré 1,9, což je na hraně mezi nadváhou a obezitou, což odpovídá heterogennímu stavu. Pacienti s morbidní obezitou způsobenou variantami v *POMC* genu bývají homozygoti nebo složení heterozygoti.

Další varianta Pro59Leu byla zachycena v 6 případech u dětí s SDS skóre mezi 0,54 – 2,3. Přítomnost této varianty u neobézních pacientů ovšem samo osobě neznamená úplnou neškodnost této varianty, jelikož rozvoj obezity je vysoce závislý na prostředí a může se projevit i v pozdějším věku. Nelze tedy vyloučit vliv varianty Pro59Leu na rozvoj obezity. U čtyř probandů s touto variantou genu *POMC* byly zaznamenány i varianty v jiných genech (vyšetření provedeno laboratoří). Jedná se o varianty v genech *BDNF, SH2B1, NTRK2 a KCNJ13* viz tabulka 19. Všechny tyto varianty byly klasifikovány jako benigní nebo pravděpodobně benigní a jednalo se o intronové varianty nebo variantu v 3´ nepřekládaném úseku.

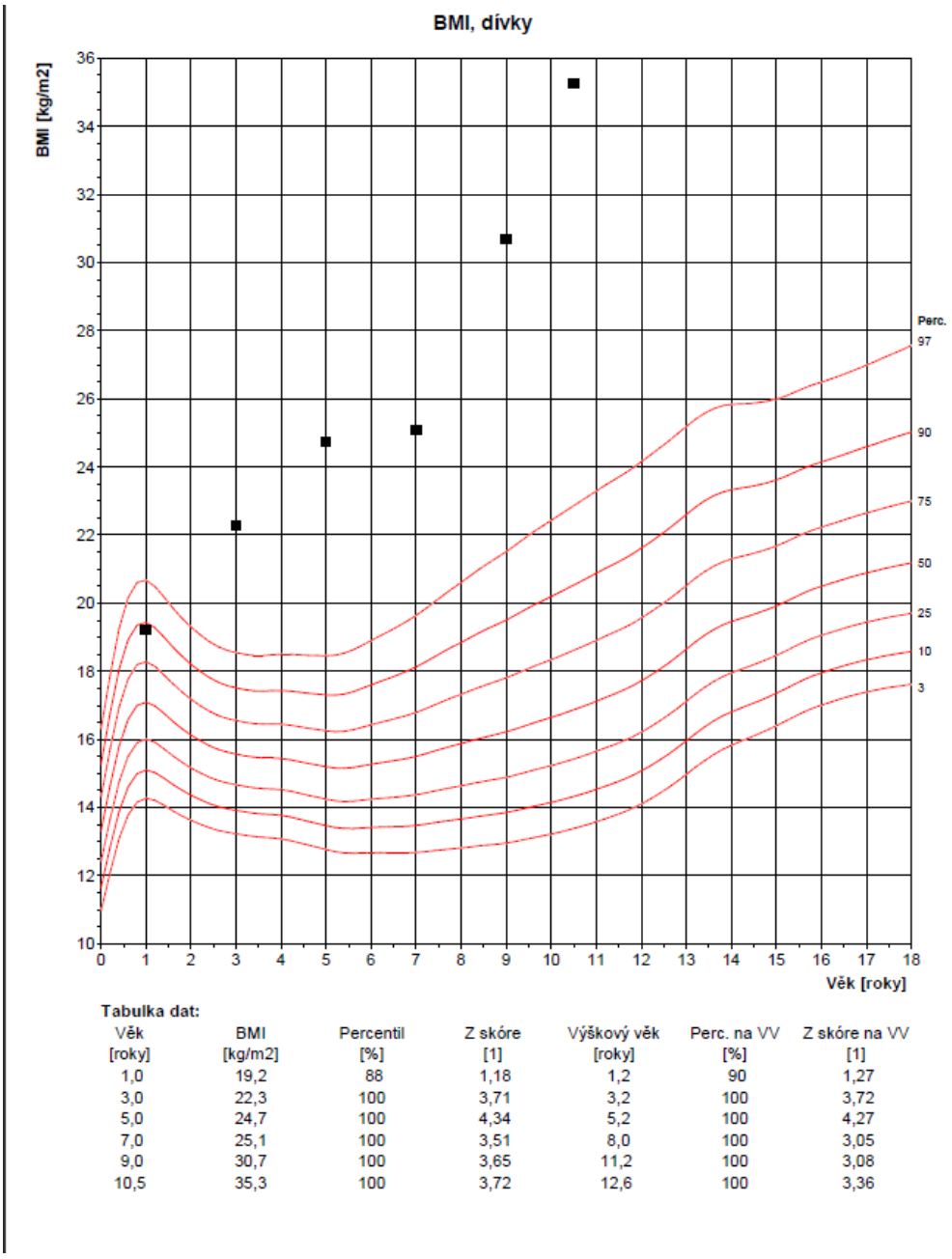
Proband	**Fenotyp**	**Varianty v genech**
OMK1522_S548_ME	Obezita	*BDNF,POMC*
E24-13_S707_ME	Nadváha	*NTRK2,KCNJ13,POMC*
E15-24_S377_ME	Normální váha	*POMC*
E27-14_S755_ME	Obezita	*POMC*
I12-26_S544_ME	Nadváha	*SH2B1,POMC*
I02-134_S155_ME	Nadváha/obezita	*NTRK2,BDNF 2x, POMC*

Tabulka 19.: Všechny nalezené varianty v genech u probandů s variantou p.Pro59Leu v genu POMC

SIM1 je základní helix-loop-helix transkripční faktor zapojen ve vývoji a funkci paraventrikulárního jádra hypothalamu, které je klíčové pro regulaci energetické homeostáze tím, že interaguje s dráhami ovlivňujícími melanokortinovou signalizaci.

U genu *SIM1* byla nalezena nová varianta Gln116Ter u 14leté dívky s z-BMI 3,71; toto odpovídá hodnotám nad 99. percentilem viz obrázek 22. BMI otce činí 47,3, což je klasifikováno jako morbidní obezita; bohužel u něj nebyla provedena genetická analýza,

a nemůžeme tak potvrdit, zda obezita u otce je způsobena stejnou mutací jako u dcery. U probandky byla kromě obezity rovněž zjištěna porušená glukózová tolerance a acanthosis nigricans. Měla také sníženou hladinu HDL cholesterolu 0,7, kdy norma se pohybuje kolem 1,34-1,80. Tato mutace zatím nebyla opublikována a nenachází se ve veřejně dostupných databázích. Můžeme proto vycházet pouze z in silico predikcí, které tuto oblast vyhodnocují jako silně konzervovanou, a vzhledem k přítomnosti obezity lze předpokládat kauzalitu této mutace.



Tabulka dat:

Věk [roky]	BMI [kg/m2]	Percentil [%]	Z skóre [1]	Výškový věk [roky]	Perc. na VV [%]	Z skóre na VV [1]
1,0	19,2	88	1,18	1,2	90	1,27
3,0	22,3	100	3,71	3,2	100	3,72
5,0	24,7	100	4,34	5,2	100	4,27
7,0	25,1	100	3,51	8,0	100	3,05
9,0	30,7	100	3,65	11,2	100	3,08
10,5	35,3	100	3,72	12,6	100	3,36

Obrázek 22.: Percentilový graf BMI dle věku u dívky OMK1517. (POMC p.Gln116Ter). Zpracováno programem RustCZ (Státní zdravotní ústav).

His83Tyr je varianta nalezená u 15leté dívky, která podstoupila redukční lázeňský pobyt. Její SDS skóre před nástupem bylo stanoveno na 2.07, nicméně šest měsíců od ukončení ozdravného pobytu v lázních bylo její SDS skóre 1,31. Redukce SDS u obézních adolescentů zmenšuje riziko kardiovaskulárních chorob již od hodnoty BMI> nebo=0.25. Nicméně nejlepší výsledky jsou vidět až u ztráty 0,5 a více BMI SDS, které vedou ke značnému snížení hodnot u klíčových rizikových metabolických faktorů jako jsou Triglyceridy (až -30 %) a LDL (až -15 %) (Reinehr et al., 2016).

U genu *BDNF* nebyly nalezeny žádné varianty, které by byly označeny jako patogenní nebo pravděpodobně patogenní.

Celkově bylo nalezeno 10 patogenních mutací u *MC4R*, 7 patogenních mutací u *POMC* a 3 patogenní mutace u *SIM1*.

V porovnání s jinými studiemi z Evropy je prevalence *MC4R* mutací u dětí ze souboru COPAT Intervence, která činí 0,44 %, jedna z nejnižších zaznamenaných; podobné hodnoty se vyskytovaly v italské studii (0,5 %) (Miraglia Del Giudice et al., 2002) a slovenské studii (0,7 %) (Stanikova et al., 2015). Nicméně u dětí ze souboru pacientů indikovaných k vyšetření na monogenní obezitu tato prevalence činila 2,51 %, což je na úrovni nálezů přechozí české studie (2,4 %) (Hainerová et al., 2007), nizozemské studie (2,1 %) (van den Berg et al., 2011) a rakouské studie (2,45 %) (Vollbach et al., 2017). Mimoevropské studie, jako je na příklad studie provedená na Guandalupe, vykazují prevalenci mutace v *MC4R* 4 %; nicméně je třeba podotknout, že tato studie byla provedena pouze na 25 africko-karibských dětech (BMI SD skóre od 2.0 do 2.8) (Foucan et al., 2018). V turecké studii byly prevalence mutace *MC4R* dokonce až 8,5 %; studie byla nicméně také provedena pouze na 47 morbidně obézních dětech (BMI SD skóre 2.72±0.37) (Tunç et al., 2017).

Tento rozdíl mezi souborem COPAT Intervence a souborem pacientů indikovaných k vyšetření na monogenní obezitu může být způsoben tím, že v souboru COPAT Intervence nebyly pouze morbidně obézní děti, ale i dětí s nižším stupněm obezity.

Prevalence mutace *MC4R* v souboru COPAT Epidemiologie, která činí 0,20 %, je velice podobná výsledkům z kontrolní části francouzské a německé studie, které stanovily prevalenci na 0,15 % (Hinney et al., 2006; Stutzmann et al., 2008).

U genu *POMC* byla prevalence stanovena na 0,50 % v souboru pacientů indikovaných k vyšetření na monogenní obezitu a 0,44 % v souboru COPAT Intervence. Pro porovnání pak lze uvést, že prevalence *POMC* v italské studii činila 1,5 % (Buono et al., 2005) 3,72 % ve francouzské studii (Dubern et al., 2008) a v norské studii 2,3 % (Nordang et al., 2017).

V Epidemiologické části studie COPAT byla stanovena prevalence *POMC* na 0,30 %. Prevalence *POMC* v kontrolní části norské studie byla určena na (1,20 %) (Nordang et al., 2017) a ve francouzské studii byla stanovena na 2,20 % (Dubern et al., 2008). Je ale důležité zmínit, že z osmi dětí z francouzské studie s mutací v *POMC,* mělo pouze jedno BMI_SDS větší než 2. V databázi ORPHA je uvedena prevalence POMC deficience na <1 / 1 000 000, nicméně tato frekvence je zmiňována pouze ve spojení s recesivním výskytem. Takto odlišné prevalence, by mohly být způsobeny jiným populačním složením studii.

V této studii byla stanovena prevalence *SIM1* na 1,00 % v souboru pacientů indikovaných k vyšetření na monogenní obezitu a 0,14 % v souboru COPAT Intervence. Ve společné americko-francouzské studii byla prevalence stanovena 2,0 % (Bonnefond et al., 2013). V souboru COPAT Epidemiologie se žádná mutace v genu *SIM1* nenašla.

Porovnávání výskytu těchto variant v české populaci oproti publikovaným výskytům u jiných populací a etnik je zatíženo značnou chybou, a to kvůli v citovaných výzkumech nejednotně zvoleným kohortám s různými stupni obezity. Proto jsou data z Epidemiologické části studie COPAT (n=978), které odpovídají náhodnému výběru z české populace, unikátní.

11.Závěr

Cílem této diplomové práce bylo stanovit mutační spektrum a frekvenční zastoupení jednotlivých variant ve vybraných genech spojených s monogenní obezitou, kódujících signalizační kaskádu melanokortinového receptoru 4. typu (geny *MC4R, POMC, SIM, BDNF*) u české obézní populace. Poznatky o prevalenci nemoci, která odráží zátěž nemoci v dané populaci, mohou sloužit při rozhodování o další péči o tyto pacienty.

I. Byla zvolena časově i finančně výhodná mikrofluidní technologie přípravy DNA knihoven. Z 1910 vzorků DNA se podařilo osekvenovat geny *MC4R, POMC, SIM* a *BDNF* u 1903 vzorků DNA (úspěšnost přípravy knihoven 99.63 %) ze 4 souborů dětí a adolescentů a to s přibližně třetinovými finančními náklady oproti jiným komerčním metodám.

II. Molekulárně genetickými metodami bylo poté identifikováno 8 různých mutací v genu *MC4R* u 10 dětí, 2 mutace v genu *POMC* u 7 dětí a 2 mutace v genu *SIM1* u 3 dětí. Byly nalezeny nové varianty v genu *SIM1,* a to získaná stop varianta a varianta sestřihového místa c.346C>T (Gln116Ter) a *POMC* missense varianta c.460C>G (Arg154Gly).

III. Výsledky z reprezentativního vzorku české populace tj souboru COPAT Epidemiologie (MC4R 0,20 %, POMC 0,30 % a SIM1 0 %) byly porovnány s výsledky české dětské a adolescentní obézní populace, kde byla prevalence suspektních nebo kauzálních mutací stanovena u souboru COPAT Intervence (*MC4R* 0,44 %*, POMC* 0,44 % a *SIM1* 0,14 %) a u souboru pacientů indikovaných k vyšetření na monogenní obezitu (*MC4R* 2,51 %, *POMC* 0,50 % a *SIM1* 1,00). Tato zjištění byla srovnána vůči jiným evropským i mimoevropským populacím.

Identifikace nových variant v leptin-melanokortinové dráze u obézních dětí umožňuje rozšířit spektrum mutací asociovaných s monogenní obezitou a obezitou celkově. Toto dále přispívá k lepšímu záchytu a možné budoucí léčbě.

12.Seznam zkratek

ACTH – Acetylcholin

AgRP – Aguti podobný peptid

ARC – Nucleus Arcuatus

BBB – Hematoencefalická bariera

BMI – Body mass index

CART – Kokain a amfetamin regulovaný tranksript

CCK – Cholecystokinin

COPAT – Childhood Obesity Prevalence And Treatment

DMH – Nucleus dorsomedialis

DNA – Deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic acid)

FA – Mastné kyseliny (Fatty acids)

FTO – Fat mass and obesity

GABA – Kyselina gama amino-máselná

GI – Gastrointestinální trakt

GLP-1 - Glukagonu podobný peptid

GWAS – celogenomová asociační studie

JAK2 – Janus Kináza 2

KCNJ13 - Draselný vnitřně napravitelný kanál člen 13 podčeledi J (Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 13)

LEP – Leptin

LEPR – Leptinový receptor

LH – Nukleus lateralis

MC 1-5 R – Melanokortinovy receptor 1-5

MSH – Melanokortin stimulujici hormon

NAFLD – Nealkoholová tuková choroba jater

NPY – Neuropeptid Y

NTRK2 – Neurotrofický receptor tyrosin kináza (neurotrophic receptor tyrosine kinase)

NTS/DMV – Nukleus tractus solitarius/ Dorsální motorický nukleus n. vagus

PACAP – Hypofýzový adenylat cyklaza-aktivující peptid

PC – Pro-konvertáza

PCSK1 – Pro-konverzáza subtilisin/kexin

POMC – Proopiomelanokortin

PYY – Peptid tyrosin tyrosin

SH2B1 – SH2B adaptorový protein 1

SIM1 – Single minded homolog 1

SNPs – Malý nukleotidový polymorfismus (Small nucleotid polymorfism)

SNV – Malá nukleotidový variace (Small nucleiotid variation)

STAT – Převodník signálu a aktivátor transkripce (Signal transducer and activator of transcription)

TE pufr Tris/EDTA pufr

VMH – Nucleus ventromedialis

WT – Standardní alela

13.Citace

ABIZAID, Alfonso, 2019. Stress and obesity: The ghrelin connection. *Journal of Neuroendocrinology* [online]. **31**(7), e12693. ISSN 1365-2826. Dostupné z: doi:10.1111/jne.12693

ADZHUBEI, Ivan, Daniel M. JORDAN a Shamil R. SUNYAEV, 2013. Predicting Functional Effect of Human Missense Mutations Using PolyPhen-2. *Current protocols in human genetics* [online]. Chapter 7:Unit7.20. ISSN 1934-8266. Dostupné z: doi:10.1002/0471142905.hg0720s76

ALLISON, Margaret B. a Martin G. MYERS, 2014. Connecting leptin signaling to biological function. *The Journal of endocrinology* [online]. **223**(1), T25–T35. ISSN 0022-0795. Dostupné z: doi:10.1530/JOE-14-0404

AYKUT, Ayça, Samim ÖZEN, Damla GÖKŞEN, Aysun ATA, Hüseyin ONAY, Tahir ATIK, Şükran DARCAN a Ferda ÖZKINAY, 2020. Melanocortin 4 receptor (MC4R) gene variants in children and adolescents having familial early-onset obesity: genetic and clinical characteristics. *European Journal of Pediatrics* [online]. **179**(9), 1445–1452. ISSN 1432-1076. Dostupné z: doi:10.1007/s00431-020-03630-7

BALDINI, Giulia a Kevin D. PHELAN, 2019. The melanocortin pathway and control of appetite-progress and therapeutic implications. *Journal of Endocrinology* [online]. **241**(1), R1–R33. ISSN 0022-0795, 1479-6805. Dostupné z: doi:10.1530/JOE-18-0596

BAXTER, Jared, Priscila Rodrigues ARMIJO, Laura FLORES, Crystal KRAUSE, Sarah SAMREEN a Tiffany TANNER, 2019. Updates on Monogenic Obesity in a Multifactorial Disease. *Obesity Surgery* [online]. **29**(12), 4077–4083. ISSN 1708-0428. Dostupné z: doi:10.1007/s11695-019-04200-z

BEATRICE DUBERN, 2015. MC4R And MC3R Mutations. *The ECOG's eBook on Child and Adolescent Obesity* [online]. [cit. 2021-07-12]. Dostupné z: https://ebook.ecog-obesity.eu/chapter-clinics-complications/mc4r-mc3r-mutations/

BECKERS, Sigri, Doreen ZEGERS, Luc F. Van GAAL a Wim Van HUL, 2009. The Role of the Leptin-Melanocortin Signalling Pathway in the Control of Food Intake. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression* [online]. **19**(4) [cit. 2021-06-24]. ISSN 1045-4403, 2162-6502. Dostupné z: doi:10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v19.i4.20

BLÜHER, Matthias, 2019. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology* [online]. **15**(5), 288–298. ISSN 1759-5037. Dostupné z: doi:10.1038/s41574-019-0176-8

BONNEFOND, Amélie, Ramsi KELLER, David MEYRE, Fanny STUTZMANN, Dorothée THUILLIER, Dimitre G. STEFANOV, Philippe FROGUEL, Fritz F. HORBER a John G. KRAL, 2016. Eating Behavior, Low-Frequency Functional Mutations in the Melanocortin-4 Receptor (MC4R) Gene, and Outcomes of Bariatric Operations: A 6-Year Prospective Study. *Diabetes Care* [online]. **39**(8), 1384–1392. ISSN 0149-5992. Dostupné z: doi:10.2337/dc16-0115

BONNEFOND, Amélie, Anne RAIMONDO, Fanny STUTZMANN, Maya GHOUSSAINI, Shwetha RAMACHANDRAPPA, David C. BERSTEN, Emmanuelle DURAND, Vincent VATIN, Beverley BALKAU, Olivier LANTIERI, Violeta RAVERDY, François PATTOU, Wim Van HUL, Luc Van GAAL, Daniel J. PEET, Jacques WEILL, Jennifer L. MILLER, Fritz HORBER, Anthony P. GOLDSTONE, Daniel J. DRISCOLL, John B. BRUNING, David MEYRE, Murray L. WHITELAW a Philippe FROGUEL, 2013. Loss-of-function mutations in *SIM1* contribute to obesity and Prader-Willi–like features. *The Journal of Clinical Investigation* [online]. **123**(7), 3037–3041. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI68035

BRANDT, Stephanie, Julia von SCHNURBEIN, Belinda LENNERZ, Katja KOHLSDORF, Heike VOLLBACH, Christian DENZER, Harald BODE, Johannes HEBEBRAND a Martin WABITSCH, 2020. Methylphenidate in children with monogenic obesity due to LEPR or MC4R deficiency improves feeling of satiety and reduces BMI-SDS—A case series. *Pediatric Obesity* [online]. **15**(1), e12577. ISSN 2047-6310. Dostupné z: doi:10.1111/ijpo.12577

BRANSON, Ruth, Natascha POTOCZNA, John G. KRAL, Klaus-Ulrich LENTES, Margret R. HOEHE a Fritz F. HORBER, 2003. Binge Eating as a Major Phenotype of Melanocortin 4 Receptor Gene Mutations. *New England Journal of Medicine* [online]. **348**(12), 1096–1103. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa021971

BUONO, Pasqualina, Fabrizio PASANISI, Carmela NARDELLI, Luigi IENO, Silvana CAPONE, Rosario LIGUORI, Carmine FINELLI, Giovannangelo ORIANI, Franco CONTALDO a Lucia SACCHETTI, 2005. Six Novel Mutations in the Proopiomelanocortin and Melanocortin Receptor 4 Genes in Severely Obese Adults Living in Southern Italy. *Clinical Chemistry* [online]. **51**(8), 1358–1364. ISSN 0009-9147. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2005.047886

BUS, Boudewijn. A. A., Marc L. MOLENDIJK, Brenda W. J. H. PENNINX, Jan K. BUITELAAR, Günter R.L. KENIS, Jos H. PRICKAERTS, Bernet M. ELZINGA a Richard C. Oude VOSHAAR, 2011. Determinants of serum brain-derived neurotrophic factor. *Psychoneuroendocrinology* [online]. **36**(2), 228–239. ISSN 0306-4530. Dostupné z: doi:10.1016/j.psyneuen.2010.07.013

BUS, Boudewijn A.A., Indira TENDOLKAR, Barbara FRANKE, Jacqueline DE GRAAF, Martin Den HEIJER, Jan K BUITELAAR a Richard C. OUDE VOSHAAR, 2012. Serum brain-derived neurotrophic factor: Determinants and relationship with depressive symptoms in a community population of middle-aged and elderly people. *The World Journal of Biological Psychiatry* [online]. **13**(1), 39–47. ISSN 1562-2975. Dostupné z: doi:10.3109/15622975.2010.545187

CARLIER, Jeremy, Raffaele GIORGETTI, Maria R. VARÌ, Filippo PIRANI, Giovanna RICCI a Francesco P. BUSARDÒ, 2019. Use of cognitive enhancers: methylphenidate and analogs. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* [online]. **23**(1), 3–15. ISSN 1128-3602. Dostupné z: doi: 10.26355/eurrev_201901_16741

CLÉMENT, Karine, Heike BIEBERMANN, I. Sadaf FAROOQI, Lex VAN DER PLOEG, Barbara WOLTERS, Christine POITOU, Lia PUDER, Fred FIEDOREK, Keith GOTTESDIENER, Gunnar KLEINAU, Nicolas HEYDER, Patrick SCHEERER,

Ulrike BLUME-PEYTAVI, Irina JAHNKE, Shubh SHARMA, Jacek MOKROSINSKI, Susanna WIEGAND, Anne MÜLLER, Katja WEISS, Knut MAI, Joachim SPRANGER, Annette GRÜTERS, Oliver BLANKENSTEIN, Heiko KRUDE a Peter KÜHNEN, 2018. MC4R agonism promotes durable weight loss in patients with leptin receptor deficiency. *Nature Medicine* [online]. **24**(5), 551–555. ISSN 1546-170X. Dostupné z: doi:10.1038/s41591-018-0015-9

COGHLAN, Matthew P. a David FAIRMAN, 2013. Chapter 6 - Therapies for type 2 diabetes: modulating the incretin pathway using small molecule peptidase inhibitors or peptide mimetics. In: Robin GANELLIN, Stanley ROBERTS a Roy JEFFERIS, ed. *Introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development* [online]. Oxford: Elsevier, s. 205–223 [cit. 2020-09-20]. ISBN 978-0-12-397176-0. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-397176-0.00006-6

COHEN, Lillian L., FEUER, Alexis a BERGSTROM, Katherine, 2016. A Novel Presentation of Proopiomelanocortin (POMC) Deficiency. *Annals of Clinical Case Reports* **1**, 3. Dostupné z: http://www.anncaserep.com/open-access/a-novel-presentation-of-proopiomelanocortin-pomc-deficiency-3920.pdf

COLLET, Tinh-Hai, Béatrice DUBERN, Jacek MOKROSINSKI, Hillori CONNORS, Julia M. KEOGH, Edson MENDES DE OLIVEIRA, Elana HENNING, Christine POITOU-BERNERT, Jean-Michel OPPERT, Patrick TOUNIAN, Florence MARCHELLI, Rohia ALILI, Johanne LE BEYEC, Dominique PÉPIN, Jean-Marc LACORTE, Andrew GOTTESDIENER, Rebecca BOUNDS, Shubh SHARMA, Cathy FOLSTER, Bart HENDERSON, Stephen O'RAHILLY, Elizabeth STONER, Keith GOTTESDIENER, Brandon L. PANARO, Roger D. CONE, Karine CLÉMENT, I. Sadaf FAROOQI a Lex H. T. VAN DER PLOEG, 2017. Evaluation of a melanocortin-4 receptor (MC4R) agonist (Setmelanotide) in MC4R deficiency. *Molecular Metabolism* [online]. **6**(10), 1321–1329. ISSN 2212-8778. Dostupné z: doi:10.1016/j.molmet.2017.06.015

COSTA COEHLO, Miguel, 2019. Out Of Rhythm: Setmelanotide Lacks Proper Placebo Controls And Has Plenty Of Adverse Events. *Seeking Alpha* [online][cit. 2020-06-21]. Dostupné z: https://seekingalpha.com/article/4303725-out-of-rhythm-setmelanotide-lacks-proper-placebo-controls-and-plenty-of-adverse-events#comments

CREEMERS, John W. M., Hélène CHOQUET, Pieter STIJNEN, Vincent VATIN, Marie PIGEYRE, Sigri BECKERS, Sandra MEULEMANS, Manuel E. THAN, Loïc YENGO, Maithé TAUBER, Beverley BALKAU, Paul ELLIOTT, Marjo-Riitta JARVELIN, Wim Van HUL, Luc Van GAAL, Fritz HORBER, François PATTOU, Philippe FROGUEL a David MEYRE, 2012. Heterozygous Mutations Causing Partial Prohormone Convertase 1 Deficiency Contribute to Human Obesity. *Diabetes* [online]. **61**(2), 383–390. ISSN 0012-1797, 1939-327X. Dostupné z: doi:10.2337/db11-0305

DUBERN, Beatrice, Cecile LUBRANO-BERTHELIER, Monica MENCARELLI, Baran ERSOY, Marie-Laure FRELUT, Dominique BOUGLÉ, Bruno COSTES, Chantal SIMON, Patrick TOUNIAN, Christian VAISSE a Karine CLEMENT, 2008. Mutational Analysis of the Pro-opiomelanocortin Gene in French Obese Children Led to the Identification of a Novel Deleterious Heterozygous Mutation Located in the α-Melanocyte Stimulating Hormone Domain. *Pediatric Research* [online]. **63**(2), 211–216. ISSN 1530-0447. Dostupné z: doi:10.1203/PDR.0b013e31815ed62b

ERICSON, Mark D., Cody J. LENSING, Katlyn A. FLEMING, Katherine N. SCHLASNER, Skye R. DOERING a Carrie HASKELL-LUEVANO, 2017. Bench-Top to Clinical Therapies: A Review of Melanocortin Ligands from 1954 to 2016. *Biochimica et biophysica acta* [online]. **1863**(10 Pt A), 2414–2435. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbadis.2017.03.020

FAROOQI, I. Sadaf, Julia M. KEOGH, Giles S. H. YEO, Emma J. LANK, Tim CHEETHAM a Stephen O'RAHILLY, 2009. Clinical Spectrum of Obesity and Mutations in the Melanocortin 4 Receptor Gene. *The New England journal of medicine [online]. 348(12), 1085–1095.*[cit. 2020-10-29]. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa022050

FOUCAN, Lydia, Laurent LARIFLA, Emmanuelle DURAND, Christine RAMBHOJAN, Christophe ARMAND, Carl-Thony MICHEL, Rachel BILLY, Véronique DHENNIN, Franck DE GRAEVE, Iandry RABEARIVELO, Olivier SAND, Jean-Marc LACORTE, Philippe FROGUEL a Amélie BONNEFOND, 2018. High Prevalence of Rare Monogenic Forms of Obesity in Obese Guadeloupean Afro-Caribbean Children. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. **103**(2), 539–545. ISSN 0021-972X. Dostupné z: doi:10.1210/jc.2017-01956

FUNCKE, Jan-Bernd, Julia VON SCHNURBEIN, Belinda LENNERZ, Georgia LAHR, Klaus-Michael DEBATIN, Pamela FISCHER-POSOVSZKY a Martin WABITSCH, 2014. Monogenic forms of childhood obesity due to mutations in the leptin gene. *Molecular and Cellular Pediatrics* [online]. **1** [cit. 2020-10-29]. ISSN 2194-7791. Dostupné z: doi:10.1186/s40348-014-0003-1

GOLDEN, Erin, Ana EMILIANO, Stuart MAUDSLEY, B. Gwen WINDHAM, Olga D. CARLSON, Josephine M. EGAN, Ira DRISCOLL, Luigi FERRUCCI, Bronwen MARTIN a Mark P. MATTSON, 2010. Circulating brain-derived neurotrophic factor and indices of metabolic and cardiovascular health: data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *PloS One* [online]. **5**(4), e10099. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0010099

GONSALVES, Rob, Kirk ALECK, Dorothee NEWBERN, Gabriel SHAIBI, Chirag KAPADIA a Oliver OATMAN, 2020. Severe early onset obesity and hypopituitarism in a child with a novel SIM1 gene mutation. *Endocrinology, Diabetes & Metabolism Case Reports* [online]. 2020, **20-0042** [cit. 2020-10-29]. ISSN 2052-0573. Dostupné z: doi:10.1530/EDM-20-0042

GRAY, Juliette, Giles S. H. YEO, Chia-Cheng HUNG, Julia M. KEOGH, Peter CLAYTON, Kalyan K. BANERJEE, Alison MCAULAY, Stephen O'RAHILLY a I. Sadaf FAROOQI, 2007. Functional characterization of human NTRK2 mutations identified in patients with severe early-onset obesity. *International Journal of Obesity (2005)* [online]. **31**(2), 359–364. ISSN 0307-0565. Dostupné z: doi:10.1038/sj.ijo.0803390

GRAY, Juliette, Giles S. H. YEO, James J. COX, Jenny MORTON, Anna-Lynne R. ADLAM, Julia M. KEOGH, Jack A. YANOVSKI, Areeg El GHARBAWY, Joan C. HAN, Y. C. Loraine TUNG, John R. HODGES, F. Lucy RAYMOND, Stephen O'RAHILLY a I. Sadaf FAROOQI, 2006. Hyperphagia, Severe Obesity, Impaired Cognitive Function, and Hyperactivity Associated With Functional Loss of One Copy

of the Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Gene. *Diabetes* [online]. **55**(12), 3366–3371. ISSN 0012-1797, 1939-327X. Dostupné z: doi:10.2337/db06-0550

HAINEROVÁ, Irena. Aldhoon a Jan LEBL, 2013. Treatment Options for Children with Monogenic Forms of Obesity. *Nutrition and Growth* [online]. **106**, 105–112. Dostupné z: doi:10.1159/000342556

HAINEROVÁ, Irena Aldhoon a Jan LEBL, 2010. Mechanisms of Appetite Regulation. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* [online]. **51**, S123. ISSN 0277-2116. Dostupné z: doi:10.1097/MPG.0b013e3181f84208

HAINEROVÁ, Irena Aldhoon, Lesli H. LARSEN, Birgitte HOLST, Marie FINKOVÁ, Vojtěch HAINER, Jan LEBL, Torben HANSEN a Oluf PEDERSEN, 2007. Melanocortin 4 Receptor Mutations in Obese Czech Children: Studies of Prevalence, Phenotype Development, Weight Reduction Response, and Functional Analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. **92**(9), 3689–3696. ISSN 0021-972X. Dostupné z: doi:10.1210/jc.2007-0352

HARNO, Erika, Thanuja GALI RAMAMOORTHY, Anthony P. COLL a Anne WHITE, 2018. POMC: The Physiological Power of Hormone Processing. *Physiological Reviews* [online]. **98**(4), 2381–2430. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00024.2017

HASKELL-LUEVANO, Carrie, 2006. Physiology and chemistry of the melanocortin pathway. *Peptides* [online]. **27**(2), 257–258. ISSN 01969781. Dostupné z: doi:10.1016/j.peptides.2005.05.008

HAY, Debbie L., Steve CHEN, Thomas A. LUTZ, David G. PARKES a Jonathan D. ROTH, 2015. Amylin: Pharmacology, Physiology, and Clinical Potential. *Pharmacological Reviews*. **67**(3), 564–600. Dostupné z: doi:10.1124/pr.115.010629

HINNEY, Anke, Isabell BECKER, Otto HEIBÜLT, Klaus NOTTEBOM, Axel SCHMIDT, Andreas ZIEGLER, Hubert MAYER, Wolfgang SIEGFRIED, Werner F. BLUM, Helmut REMSCHMIDT a Johannes HEBEBRAND, 1998. Systematic Mutation Screening of the Pro-Opiomelanocortin Gene: Identification of Several Genetic Variants Including Three Different Insertions, One Nonsense and Two Missense Point Mutations in Probands of Different Weight Extremes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. **83**(10), 3737–3741. ISSN 0021-972X. Dostupné z: doi:10.1210/jcem.83.10.5298

HINNEY, Anke, Axel SCHMIDT, Klaus NOTTEBOM, Otto HEIBÜLT, Isabell BECKER, Andreas ZIEGLER, Gloria GERBER, Mercede SINA, Tilman GÖRG, Hubert MAYER, Wolfgang SIEGFRIED, Manfred FICHTER, Helmut REMSCHMIDT a Johannes HEBEBRAND, 1999. Several Mutations in the Melanocortin-4 Receptor Gene Including a Nonsense and a Frameshift Mutation Associated with Dominantly Inherited Obesity in Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. **84**(4), 1483–1486. ISSN 0021-972X. Dostupné z: doi:10.1210/jcem.84.4.5728

HINNEY, Anke, Thomas BETTECKEN, Patrick TARNOW, Harald BRUMM, Kathrin REICHWALD, Peter LICHTNER, André SCHERAG, Thuy Trang NGUYEN, Pia SCHLUMBERGER, Winfried RIEF, Caren VOLLMERT, Thomas ILLIG, H.-Erich

WICHMANN, Helmut SCHÄFER, Matthias PLATZER, Heike BIEBERMANN, Thomas MEITINGER a Johannes HEBEBRAND, 2006. Prevalence, spectrum, and functional characterization of melanocortin-4 receptor gene mutations in a representative population-based sample and obese adults from Germany. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* [online]. **91**(5), 1761–1769. ISSN 0021-972X. Dostupné z: doi:10.1210/jc.2005-2056

HINNEY, Anke, Sarah HOHMANN, Frank GELLER, Constanze VOGEL, Claudia HESS, Anne-Kathrin WERMTER, Britta BROKAMP, Hanspeter GOLDSCHMIDT, Wolfgang SIEGFRIED, Helmut REMSCHMIDT, Helmut SCHÄFER, Thomas GUDERMANN a Johannes HEBEBRAND, 2003. Melanocortin-4 receptor gene: case-control study and transmission disequilibrium test confirm that functionally relevant mutations are compatible with a major gene effect for extreme obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* [online]. **88**(9), 4258–4267. ISSN 0021-972X. Dostupné z: doi:10.1210/jc.2003-030233

HOPKINS, Mark, John BLUNDELL, Jason HALFORD, Neil KING a Graham FINLAYSON, 2000. The Regulation of Food Intake in Humans. In: Kenneth R. FEINGOLD, Bradley ANAWALT, Alison BOYCE, George CHROUSOS, Wouter W. DE HERDER, Ketan DHATARIYA, Kathleen DUNGAN, Ashley GROSSMAN, Jerome M. HERSHMAN, Johannes HOFLAND, Sanjay KALRA, Gregory KALTSAS, Christian KOCH, Peter KOPP, Márta KORBONITS, Christopher S. KOVACS, Wendy KUOHUNG, Blandine LAFERRÈRE, Elizabeth A. MCGEE, Robert MCLACHLAN, John E. MORLEY, Maria NEW, Jonathan PURNELL, Rakesh SAHAY, Frederick SINGER, Constantine A. STRATAKIS, Dace L. TRENCE a Don P. WILSON, editors. *Endotext* [online]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc. [cit. 2021-06-18]. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278931/

HUANG, Xiaoyi, Meihua LIANG a Biyue WEI, 2019. The Effect of Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1) on Obesity. *Critical Care Obstetrics and Gynecology* [online]. **05**(01) [cit. 2020-09-20]. ISSN 24719803. Dostupné z: doi:10.21767/2471-9803.1000171

HUNTER, Kerry a Christian HÖLSCHER, 2012. Drugs developed to treat diabetes, liraglutide and lixisenatide, cross the blood brain barrier and enhance neurogenesis. *BMC Neuroscience* [online]. **13**(1), 33. ISSN 1471-2202. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2202-13-33

CHAN, Ka Lok, Kai Yu TONG a Shea Ping YIP, 2008. Relationship of serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and health-related lifestyle in healthy human subjects. *Neuroscience Letters* [online]. **447**(2), 124–128. ISSN 0304-3940. Dostupné z: doi:10.1016/j.neulet.2008.10.013

CHEN, Kong Y., Ranganath MUNIYAPPA, Brent S. ABEL, Katherine P. MULLINS, Pamela STAKER, Robert J. BRYCHTA, Xiongce ZHAO, Michael RING, Tricia L. PSOTA, Roger D. CONE, Brandon L. PANARO, Keith M. GOTTESDIENER, Lex H.T. VAN DER PLOEG, Marc L. REITMAN a Monica C. SKARULIS, 2015. RM-493, a Melanocortin-4 Receptor (MC4R) Agonist, Increases Resting Energy Expenditure in Obese Individuals. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* [online]. **100**(4), 1639–1645. ISSN 0021-972X. Dostupné z: doi:10.1210/jc.2014-4024

CHUNG, Wendy K., 2012. An overview of mongenic and syndromic obesities in humans. *Pediatric Blood & Cancer* [online]. **58**(1), 122–128. ISSN 15455009. Dostupné z: doi:10.1002/pbc.23372

CHUNG, Wendy K. a Rudolph L. LEIBEL, 2005. Molecular physiology of syndromic obesities in humans. *Trends in Endocrinology & Metabolism* [online]. **16**(6), 267–272. ISSN 10432760. Dostupné z: doi:10.1016/j.tem.2005.06.009

IEPSEN, Eva W., Jinyi ZHANG, Henrik S. THOMSEN, Elizaveta L. HANSEN, Mette HOLLENSTED, Sten MADSBAD, Torben HANSEN, Jens J. HOLST, Jens-Christian HOLM a Signe S. TOREKOV, 2018. Patients with Obesity Caused by Melanocortin-4 Receptor Mutations Can Be Treated with a Glucagon-like Peptide-1 Receptor Agonist. *Cell Metabolism* [online]. **28**(1), 23-32.e3. ISSN 15504131. Dostupné z: doi:10.1016/j.cmet.2018.05.008

JAMAL, Mumtaz, Willem VAN DER DOES, Bernet M. ELZINGA, Marc L. MOLENDIJK a Brenda W.J.H. PENNINX, 2015. Association Between Smoking, Nicotine Dependence, and BDNF Val66Met Polymorphism with BDNF Concentrations in Serum. *Nicotine & Tobacco Research* [online]. **17**(3), 323–329. ISSN 1462-2203. Dostupné z: doi:10.1093/ntr/ntu151

JENSEN, Devon, 2015. *The Best Variant Prediction Method That No One Is Using | Enlis Genomics Blog* [online]. [cit. 2022-04-22]. Dostupné z: http://www.enlis.com/blog/2015/03/17/the-best-variant-prediction-method-that-no-one-is-using/

KIM, Daniel, Wei HOU, Fusheng WANG a Chrisa ARCAN, 2019. Factors Affecting Obesity and Waist Circumference Among US Adults. *Preventing Chronic Disease* [online]. **16** [cit. 2020-10-29]. ISSN 1545-1151. Dostupné z: doi:10.5888/pcd16.180220

KIM, Ki-Suk, Randy J. SEELEY a Darleen A. SANDOVAL, 2018. Signalling from the periphery to the brain that regulates energy homeostasis. *Nature Reviews Neuroscience* [online]. **19**(4), 185–196. ISSN 1471-0048. Dostupné z: doi:10.1038/nrn.2018.8

KIRCHER, Martin, Daniela M. WITTEN, Preti JAIN, Brian J. O'ROAK, Gregory M. COOPER a Jay SHENDURE, 2014. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nature Genetics* [online]. **46**(3), 310–315. ISSN 1546-1718. Dostupné z: doi:10.1038/ng.2892

KISHI, Toshiro, Carl J. ASCHKENASI, Charlotte E. LEE, Kathleen G. MOUNTJOY, Clifford B. SAPER a Joel K. ELMQUIST, 2003. Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. *Journal of Comparative Neurology* [online]. **457**(3), 213–235. ISSN 1096-9861. Dostupné z: doi:10.1002/cne.10454

KOUBKOVÁ, Lucie, Bořivoj VOJTĚŠEK a Rostislav VYZULA, 2014. Next Generation Sequencing – Application in Clinical Practice. *Klinicka onkologie* [online]. **27**(Suppl 1), S61–S68. ISSN 0862495X, 18025307. Dostupné z: doi:10.14735/amko20141S61

KÜHNEN, Peter, Karine CLÉMENT, Susanna WIEGAND, Oliver BLANKENSTEIN, Keith GOTTESDIENER, Lea L. MARTINI, Knut MAI, Ulrike BLUME-PEYTAVI, Annette GRÜTERS a Heiko KRUDE, 2016. Proopiomelanocortin Deficiency Treated

with a Melanocortin-4 Receptor Agonist. *New England Journal of Medicine* [online]. **375**(3), 240–246. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa1512693

KÜHNEN, Peter, Heiko KRUDE a Heike BIEBERMANN, 2019. Melanocortin-4 Receptor Signalling: Importance for Weight Regulation and Obesity Treatment. *Trends in Molecular Medicine* [online]. **25**(2), 136–148. ISSN 1471-4914. Dostupné z: doi:10.1016/j.molmed.2018.12.002

Kurabo Industries Ltd., 2022. *Kurabo Industries Ltd.* [online] [cit. 2022a-04-08]. Dostupné
z: https://www.kurabo.co.jp/bio/English/product/tableTemplatePdf.php?f=22&r=2&c=4&&t=2

LE BEYEC, Johanne, Christine CUGNET-ANCEAU, Dominique PÉPIN, Rohia ALILI, Aurelie COTILLARD, Jean-Marc LACORTE, Arnaud BASDEVANT, Martine LAVILLE a Karine CLÉMENT, 2013. Homozygous leptin receptor mutation due to uniparental disomy of chromosome 1: response to bariatric surgery. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* [online]. **98**(2), E397-402. ISSN 1945-7197. Dostupné z: doi:10.1210/jc.2012-2779

LEDDY, John J., Leonard H. EPSTEIN, Jodie L. JARONI, James N. ROEMMICH, Rocco A. PALUCH, Gary S. GOLDFIELD a Caryn LERMAN, 2004. Influence of Methylphenidate on Eating in Obese Men. *Obesity Research* [online]. **12**(2), 224–232. ISSN 1550-8528. Dostupné z: doi:10.1038/oby.2004.29

LEE, Yung Seng, Ben G. CHALLIS, Darren A. THOMPSON, Giles S. H. YEO, Julia M. KEOGH, Michael E. MADONNA, Vicki WRAIGHT, Matthew SIMS, Vincent VATIN, David MEYRE, Julian SHIELD, Christine BURREN, Zala IBRAHIM, Tim CHEETHAM, Peter SWIFT, Anthea BLACKWOOD, Chiao-Chien Connie HUNG, Nicholas J. WAREHAM, Philippe FROGUEL, Glenn L. MILLHAUSER, Stephen O'RAHILLY a I. Sadaf FAROOQI, 2006. A POMC variant implicates β-melanocyte-stimulating hormone in the control of human energy balance. *Cell Metabolism* [online]. **3**(2), 135–140. ISSN 1550-4131. Dostupné z: doi:10.1016/j.cmet.2006.01.006

LEE, Yung Seng, Larry Kok Seng POH, Betty Lay Kee KEK a Kah Yin LOKE, 2008. Novel melanocortin 4 receptor gene mutations in severely obese children. *Clinical Endocrinology* [online]. **68**(4), 529–535. ISSN 1365-2265. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2265.2007.03071.x

LIN, Chen Hsiu, Li SHAO, Yu Mei ZHANG, Yu Ju TU, Yuzhen ZHANG, Brian TOMLINSON, Paul CHAN a Zhongmin LIU, 2020. An evaluation of liraglutide including its efficacy and safety for the treatment of obesity. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* [online]. **21**(3), 275–285. ISSN 1465-6566. Dostupné z: doi:10.1080/14656566.2019.1695779

LOH, Kim, Yan-Chuan SHI, Mohammed BENSELLAM, Kailun LEE, D. Ross LAYBUTT a Herbert HERZOG, 2018. Y1 receptor deficiency in β-cells leads to increased adiposity and impaired glucose metabolism. *Scientific Reports* [online]. **8**(1), 11835. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-30140-2

LONATI, Caterina, Stefano GATTI a Anna CATANIA, 2020. Activation of Melanocortin Receptors as a Potential Strategy to Reduce Local and Systemic Reactions Induced by Respiratory Viruses. *Frontiers in Endocrinology* [online]. **11** [vid. 2021-06-24]. ISSN 1664-2392. Dostupné z: doi:10.3389/fendo.2020.569241

LOUREIRO-VIEIRA, Sara, Vera Marisa COSTA, Maria DE LOURDES BASTOS, Félix CARVALHO a João Paulo CAPELA, 2017. Methylphenidate effects in the young brain: friend or foe? *International Journal of Developmental Neuroscience* [online]. **60**(1), 34–47. ISSN 0736-5748. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijdevneu.2017.04.002

LUXY, John, 2019. Hypothalamic Nuclei. *Obesity and Diabetes* [online] [cit. 2019-04-30]. Dostupné z: http://www.diabetesobesity.org.uk/hypothalamic-nuclei.html

MEHTA, A., S. P. MARSO a I. J. NEELAND, 2017. Liraglutide for weight management: a critical review of the evidence. *Obesity Science & Practice* [online]. **3**(1), 3–14. ISSN 2055-2238. Dostupné z: doi:10.1002/osp4.84

MIRAGLIA DEL GIUDICE, Emanuele, Grazia CIRILLO, Vincenzo NIGRO, Nicola SANTORO, Laura D'URSO, Paolo RAIMONDO, Domenico COZZOLINO, D. SCAFATO a Laura PERRONE, 2002. Low frequency of melanocortin-4 receptor (MC4R) mutations in a Mediterranean population with early-onset obesity. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* [online]. **26**(5), 647–651. Dostupné z: doi:10.1038/sj.ijo.0801983

MIRAGLIA DEL GIUDICE, Emanuele, Grazia CIRILLO, Nicola SANTORO, Laura D'URSO, Maria T. CARBONE, Rosario DI TORO a Laura PERRONE, 2001. Molecular screening of the proopiomelanocortin (POMC) gene in Italian obese children: report of three new mutations. *International Journal of Obesity* [online]. **25**(1), 61–67. ISSN 1476-5497. Dostupné z: doi:10.1038/sj.ijo.0801485

MOON, Byoung Chon a Jeffrey M. FRIEDMAN, 1997. The Molecular Basis of the Obese Mutation in ob2JMice. *Genomics* [online]. **42**(1), 152–156. ISSN 0888-7543. Dostupné z: doi:10.1006/geno.1997.4701

MORTON, W. Alexander a Gwendolyn G. STOCKTON, 2000. Methylphenidate Abuse and Psychiatric Side Effects. *Primary Care Companion to The Journal of Clinical Psychiatry*. **2**(5), 159–164. ISSN 1523-5998. Dostupné z: doi: 10.4088/pcc.v02n0502

MOSCOWITZ, Anna Elizabeth, Huda ASIF, Laurence Baily LINDENMAIER, Andrew CALZADILLA, Chongxu ZHANG a Mehdi MIRSAEIDI, 2019. The Importance of Melanocortin Receptors and Their Agonists in Pulmonary Disease. *Frontiers in Medicine* [online]. **6** [vid. 2022-04-19]. ISSN 2296-858X. Dostupné z: https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmed.2019.00145

NIAZI, Robina Khan, Anette P. GJESING, Mette HOLLENSTED, Christian Theil HAVE, Niels GRARUP, Oluf PEDERSEN, Asmat ULLAH, Gulbin SHAHID, Wasim AHMAD, Asma GUL a Torben HANSEN, 2018. Identification of novel LEPR mutations in Pakistani families with morbid childhood obesity. *BMC Medical Genetics* [online]. **19**(1), 199. ISSN 1471-2350. Dostupné z: doi:10.1186/s12881-018-0710-x

NORDANG, Gry B. N., Øyvind L. BUSK, Kristian TVETEN, Hans Ivar HANEVIK, Anne Kristin M. FELL, Jøran HJELMESÆTH, Øystein L. HOLLA a Jens K. HERTEL, 2017. Next-generation sequencing of the monogenic obesity genes LEP, LEPR, MC4R, PCSK1 and POMC in a Norwegian cohort of patients with morbid obesity and normal weight controls. *Molecular Genetics and Metabolism* [online]. **121**(1), 51–56. ISSN 1096-7192. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymgme.2017.03.007

OKONKWO, Oluchukwu, David ZEZOFF a Adebayo ADEYINKA, 2020. Biochemistry, Cholecystokinin. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [cit. 2020-10-30]. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534204/

ORPHA.NET, 2021. *Orpha.net: Obezita způsobená deficitem proopiomelanokortinu* [online] [cit. 2021-12-20]. Dostupné z: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=CS&data_id=11020&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=POMC&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Onemocn%C4%9Bn%C3%AD/skupina%20onemocn%C4%9Bn%C3%AD=Obezita-zp-isobene--deficitem-proopiomelanokortinu&title=Obezita%20zp%C5%AFsoben%C3%A1%20deficitem%20proopiomelanokortinu&search=Disease_Search_Simple

OSWAL, Ashwini a Giles S. H. YEO, 2007. The leptin melanocortin pathway and the control of body weight: lessons from human and murine genetics. *Obesity Reviews* [online]. **8**(4), 293–306. ISSN 1467-7881, 1467-789X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1467-789X.2007.00378.x

PATEL, Dhiren K. a Fatima C. STANFORD, 2018. Safety and tolerability of new-generation anti-obesity medications: a narrative review. *Postgraduate medicine* [online]. **130**(2), 173–182. ISSN 0032-5481. Dostupné z: doi:10.1080/00325481.2018.1435129

PHILIPPE, Julien, Pieter STIJNEN, David MEYRE, Franck DE GRAEVE, Dorotheé THUILLIER, Jérôme DELPLANQUE, Gabor GYAPAY, Olivier SAND, John W. CREEMERS, Philippe FROGUEL a Amélie BONNEFOND, 2015. A nonsense loss-of-function mutation in PCSK1 contributes to dominantly inherited human obesity. *International Journal of Obesity* [online]. **39**(2), 295–302. ISSN 1476-5497. Dostupné z: doi:10.1038/ijo.2014.96

PUKLOVÁ, Vladimíra, 2018. Vyskyt nadvahy a obezity 2018. *Státní zdravotní ústav* [online].Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/chzp/info_listy/Vyskyt_nadvahy_a_obezity_2018.pdf

QUANG, Daniel, Yifei CHEN a Xiaohui XIE, 2015. DANN: a deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants. *Bioinformatics* [online]. **31**(5), 761–763. ISSN 1367-4803. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/btu703

RAMACHANDRAPPA, Shwetha, Anne RAIMONDO, Anna M. G. CALI, Julia M. KEOGH, Elana HENNING, Sadia SAEED, Amanda THOMPSON, Sumedha GARG, Elena G. BOCHUKOVA, Soren BRAGE, Victoria TROWSE, Eleanor WHEELER, Adrienne E. SULLIVAN, Mehul DATTANI, Peter E. CLAYTON, Vippan DATTA, John B. BRUNING, Nick J. WAREHAM, Stephen O'RAHILLY, Daniel J. PEET, Ines BARROSO, Murray L. WHITELAW a I. Sadaf FAROOQI, 2013. Rare variants in

single-minded 1 (*SIM1*) are associated with severe obesity. *The Journal of Clinical Investigation* [online]. **123**(7), 3042–3050. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI68016

RAPPLEY, Marsha D., 1997. Safety Issues in the Use of Methylphenidate. *Drug Safety* [online]. **17**(3), 143–148. ISSN 1179-1942. Dostupné z: doi:10.2165/00002018-199717030-00001

REINEHR, Thomas, Johannes HEBEBRAND, Susann FRIEDEL, André M. TOSCHKE, Harald BRUMM, Heike BIEBERMANN a Anke HINNEY, 2009. Lifestyle Intervention in Obese Children With Variations in the Melanocortin 4 Receptor Gene. *Obesity* [online]. **17**(2), 382–389. ISSN 1930-739X. Dostupné z: doi:10.1038/oby.2008.422

REINEHR, Thomas, Nina LASS, Christina TOSCHKE, Juliane ROTHERMEL, Stefanie LANZINGER a Reinhard W. HOLL, 2016. Which Amount of BMI-SDS Reduction Is Necessary to Improve Cardiovascular Risk Factors in Overweight Children? *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. **101**(8), 3171–3179. ISSN 0021-972X. Dostupné z: doi:10.1210/jc.2016-1885

ROUSKAS, Konstantinos, David MEYRE, Fanny STUTZMANN, Konstantinos PALETAS, Dimitrios PAPAZOGLOU, Vincent VATIN, Marion MARCHAND, Anastasia KOUVATSI a Philippe FROGUEL, 2012. Loss-of-Function Mutations in MC4R Are Very Rare in the Greek Severely Obese Adult Population. *Obesity* [online]. **20**(11), 2278–2282. ISSN 1930-739X. Dostupné z: doi:10.1038/oby.2012.77

ROVITE, Vita, Ramona PETROVSKA, Iveta VAIVADE, Ineta KALNINA, Davids FRIDMANIS, Linda ZAHARENKO, Raitis PECULIS, Valdis PIRAGS, Helgi B. SCHIOTH a Janis KLOVINS, 2014. The role of common and rare MC4R variants and FTO polymorphisms in extreme form of obesity. *Molecular Biology Reports* [online]. **41**(3), 1491–1500. ISSN 1573-4978. Dostupné z: doi:10.1007/s11033-013-2994-4

SAEED, Sadia, Taeed A. BUTT, Mehwish ANWER, Muhammad ARSLAN a Philippe FROGUEL, 2012. High prevalence of leptin and melanocortin-4 receptor gene mutations in children with severe obesity from Pakistani consanguineous families. *Molecular Genetics and Metabolism* [online]. **106**(1), 121–126. ISSN 10967192. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymgme.2012.03.001

SHEN, Wen-jie, Ting YAO, Xingxing KONG, Kevin W. WILLIAMS a Tiemin LIU, 2017. Melanocortin neurons: Multiple routes to regulation of metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* [online]. **1863**(10, Part A), Melanocortin Receptors, 2477–2485. ISSN 0925-4439. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbadis.2017.05.007

SCHULZ, Leslie O., Peter H. BENNETT, Eric RAVUSSIN, Judith R. KIDD, Kenneth K. KIDD, Julian ESPARZA a Mauro E. VALENCIA, 2006. Effects of Traditional and Western Environments on Prevalence of Type 2 Diabetes in Pima Indians in Mexico and the U.S. *Diabetes Care* [online]. **29**(8), 1866–1871. ISSN 0149-5992, 1935-5548. Dostupné z: doi:10.2337/dc06-0138

SCHWARZ, Jana Marie, Christian RÖDELSPERGER, Markus SCHUELKE a Dominik SEELOW, 2010. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nature Methods* [online]. **7**(8), 575–576. ISSN 1548-7105. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth0810-575

SMITH, Pauline M. a Alastair V. FERGUSON, 2008. Neurophysiology of hunger and satiety. *Developmental Disabilities Research Reviews* [online]. **14**(2), 96–104. ISSN 1940-5529. Dostupné z: doi:10.1002/ddrr.13

SOBRINO CRESPO, Carmen, Aránzazu PERIANES CACHERO, Lilian PUEBLA JIMÉNEZ, Vicente BARRIOS a Eduardo ARILLA FERREIRO, 2014. Peptides and Food Intake. *Frontiers in Endocrinology* [online]. **5**, 58. ISSN 1664-2392. Dostupné z: doi:10.3389/fendo.2014.00058

SRIVASTAVA, Gitanjali a Caroline APOVIAN, 2018. Future Pharmacotherapy for Obesity: New Anti-obesity Drugs on the Horizon. *Current Obesity Reports* [online]. **7**(2), 147–161. ISSN 2162-4968. Dostupné z: doi:10.1007/s13679-018-0300-4

STANIKOVA, Daniela, M. SUROVA, Lubica TICHA, Miroslava PETRASOVA, Daniela VIRGOVA, Miroslava HUCKOVA, Martina SKOPKOVA, Denisa LOBOTKOVA, Lucia VALENTINOVA, Michal MOKAN, Juraj STANIK, Iwar KLIMES a Daniela GASPERIKOVA, 2015. Melanocortin-4 receptor gene mutations in obese Slovak children. *Physiological Research* [online]. **64**(6), 883–890. ISSN 1802-9973. Dostupné z: doi:10.33549/physiolres.932968

Státní ústav pro kontrolu léčiv, 2020. *RITALIN, 10MG TBL NOB 30* [online] [cit. 2020b-09-20].Dostupné
z: http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0015622&tab=info

STRYJECKI, Carolina, Akram ALYASS a David MEYRE, 2018. Ethnic and population differences in the genetic predisposition to human obesity. *Obesity Reviews* [online]. **19**(1), 62–80. ISSN 1467-789X. Dostupné z: doi:10.1111/obr.12604

STUTZMANN, Fanny, Karen TAN, Vincent VATIN, Christian DINA, Béatrice JOURET, Jean TICHET, Beverley BALKAU, Natascha POTOCZNA, Fritz HORBER, Stephen O'RAHILLY, I. Sadaf FAROOQI, Philippe FROGUEL a David MEYRE, 2008. Prevalence of Melanocortin-4 Receptor Deficiency in Europeans and Their Age-Dependent Penetrance in Multigenerational Pedigrees. *Diabetes* [online]. **57**(9), 2511–2518. ISSN 0012-1797, 1939-327X. Dostupné z: doi:10.2337/db08-0153

SUVIOLAHTI, Elina, Martin RIDDERSTRÅLE, Peter ALMGREN, Mia KLANNEMARK, Olle MELANDER, Emma CARLSSON, Margareta CARLSSON, Jan HEDENBRO a Marju ORHO-MELANDER, 2003. Pro-opiomelanocortin gene is associated with serum leptin levels in lean but not in obese individuals. *International Journal of Obesity* [online]. **27**(10), 1204–1211. ISSN 1476-5497. Dostupné z: doi:10.1038/sj.ijo.0802392

SUWA, Masataka, Hiroyo KISHIMOTO, Yu NOFUJI, Hiroshi NAKANO, Haruka SASAKI, Zsolt RADAK a Shuzo KUMAGAI, 2006. Serum brain-derived neurotrophic factor level is increased and associated with obesity in newly diagnosed female patients

with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* [online]. **55**(7), 852–857. ISSN 0026-0495. Dostupné z: doi:10.1016/j.metabol.2006.02.012

TAN, Karen, Irina D POGOZHEVA, Giles S H YEO, Dirk HADASCHIK, Julia M KEOGH, Carrie HASKELL-LEUVANO, Stephen O'RAHILLY, Henry I MOSBERG a I Sadaf FAROOQI, 2009. Functional characterization and structural modeling of obesity associated mutations in the melanocortin 4 receptor. *Endocrinology* [online]. 2008/09/18 vyd. **150**(1), 114–125. ISSN 0013-7227. Dostupné z: doi:10.1210/en.2008-0721

TARNOW, Patrick, Anne REDIGER, Kurt WIDHALM, Susann FRIEDEL, Gunnar KLEINAU, Hanno BOLZ, Thomas BETTECKEN, Anke HINNEY, Gerd KRAUSE, Annette GRUTERS a Heike BIEBERMANN, 2008. Molecular insights in dysfunctions of the human melanocortin-4-receptor (MC4R) caused by mutations in the third transmembrane domain (TM3) and the second intracellular loop. *Endocrine Abstracts* [online]. **16** [cit. 2022-04-12]. ISSN 1470-3947, 1479-6848. Dostupné z: https://www.endocrine-abstracts.org/ea/0016/ea0016p538

TIMPER, Katharina a Jens C. BRÜNING, 2017. Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity. *Disease Models & Mechanisms* [online]. **10**(6), 679–689. ISSN 1754-8403. Dostupné z: doi:10.1242/dmm.026609

TRAURIG, Michael, Janel MACK, Robert L. HANSON, Maya GHOUSSAINI, David MEYRE, William C. KNOWLER, Sayuko KOBES, Philippe FROGUEL, Clifton BOGARDUS a Leslie J. BAIER, 2009. Common Variation in SIM1 Is Reproducibly Associated With BMI in Pi ma Indians. *Diabetes* [online]. **58**(7), 1682–1689. ISSN 0012-1797. Dostupné z: doi:10.2337/db09-0028

TRUJILLO, Jennifer M. a Wesley NUFFER, 2014. GLP-1 Receptor Agonists for Type 2 Diabetes Mellitus: Recent Developments and Emerging Agents. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* [online]. **34**(11), 1174–1186. ISSN 1875-9114. Dostupné z: doi:10.1002/phar.1507

TUNÇ, Selma, Korcan DEMIR, Fatma Ajlan TÜKÜN, Cihan TOPAL, Filiz HAZAN, Burcu SAĞLAM, Özlem NALBANTOĞLU, Melek YILDIZ a Behzat ÖZKAN, 2017. Melanocortin-4 Receptor Gene Mutations in a Group of Turkish Obese Children and Adolescents. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology* [online]. **9**(3), 216–221. ISSN 1308-5735. Dostupné z: doi:10.4274/jcrpe.4225

VAISSE, Christian, Karine CLEMENT, Emmanuelle DURAND, Serge HERCBERG, Bernard GUY-GRAND a Philippe FROGUEL, 2000. Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *The Journal of Clinical Investigation* [online]. **106**(2), 253–262. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI9238

VAN DEN BERG, Linda, Olivier VAN BEEKUM, Peter HEUTINK, Bram A. FELIUS, Monique P.M. VAN DE HEIJNING, Stefan STRIJBIS, Rosalina VAN SPAENDONK, Daniela PIANCATELLI, Keith M. GARNER, Rajae EL-AOUAD, Erik SISTERMANS, Roger A.H. ADAN a Henriette A. DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011. Melanocortin-4 Receptor Gene Mutations in a Dutch Cohort of

Obese Children. *Obesity* [online]. **19**(3), 604–611. ISSN 1930-739X. Dostupné z: doi:10.1038/oby.2010.259

VASER, Robert, Swarnaseetha ADUSUMALLI, Sim Ngak LENG, Mile SIKIC a Pauline C NG, 2016. SIFT missense predictions for genomes. *Nature Protocols* [online]. **11**(1), 1–9. ISSN 1750-2799. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2015.123

VOLLBACH, Heike, Stefanie BRANDT, Georgia LAHR, Christian DENZER, Julia VON SCHNURBEIN, Klaus-Michael DEBATIN a Martin WABITSCH, 2017. Prevalence and phenotypic characterization of MC4R variants in a large pediatric cohort. *International Journal of Obesity* [online]. **41**(1), 13–22. ISSN 1476-5497. Dostupné z: doi:10.1038/ijo.2016.161

WANG, Shuo, Jieyun SONG, Yide YANG, Nitesh V. CHAWLA, Jun MA a Haijun WANG, 2017. Rs12970134 near MC4R is associated with appetite and beverage intake in overweight and obese children: A family-based association study in Chinese population. *PloS One* [online]. **12**(5), e0177983. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0177983

WANG, Wei, Dong-Yu GUO, Yue-Jun LIN a Ya-Xiong TAO, 2019. Melanocortin Regulation of Inflammation. *Frontiers in Endocrinology* [online]. **10** [vid. 2020-10-30]. ISSN 1664-2392. Dostupné z: doi:10.3389/fendo.2019.00683

WANG, Wei, Yue-Jun LIN, Zhao-Xia CHEN a Dong-Yu GUO, 2021. Identification and characterization of two novel melanocortin-3 receptor mutations in Chinese obese individuals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* [online]. **1867**(6), 166107. ISSN 0925-4439. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbadis.2021.166107

WASIM, Muhammad, Fazli Rabbi AWAN, Syeda Sadia NAJAM, Abdul Rehman KHAN a Haq Nawaz KHAN, 2016. Role of Leptin Deficiency, Inefficiency, and Leptin Receptors in Obesity. *Biochemical Genetics* [online]. **54**(5), 565–572. ISSN 1573-4927. Dostupné z: doi:10.1007/s10528-016-9751-z

WHARTON, Sean, Aiden LIU, Arash PAKSERESHT, Emil NØRTOFT, Christiane L. HAASE, Johanna MANCINI, G. Sarah POWER, Sarah VANDERLELIE a Rebecca A. G. CHRISTENSEN, 2019. Real-World Clinical Effectiveness of Liraglutide 3.0 mg for Weight Management in Canada. *Obesity* [online]. **27**(6), 917–924. ISSN 1930-739X. Dostupné z: doi:10.1002/oby.22462

WHO, 2021. *WHO | World Health Organization* [online] [cit. 2019c-04-07]. Dostupné z: https://www.who.int/topics/obesity/en/

WILANTHO, Alisa, Oranud PRADITSAP, Wanwisa CHAROENCHIM, Supasak KULAWONGANUNCHAI, Anunchai ASSAWAMAKIN a Sissades TONGSIMA, 2012. Next generation sequencing (NGS) technologies and their applications in omics-research. *Thai Journal of Genetics*. **5**. Dostupné z: https://www.semanticscholar.org/paper/Next-generation-sequencing-(NGS)-technologies-and-Wilantho-Praditsup/c2ce2d37c097ee09dbd1f9fbb7d6133e8c3385cc

XIANG, Zhimin, Bettina PRONETH, Marvin L. DIRAIN, Sally A. LITHERLAND a Carrie HASKELL-LUEVANO, 2010. Pharmacological Characterization of 30 Human

Melanocortin-4 Receptor Polymorphisms with the Endogenous Proopiomelanocortin Derived Agonists, Synthetic Agonists, and the Endogenous Agouti-Related Protein (AGRP) Antagonist. *Biochemistry* [online]. **49**(22), 4583–4600. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi100068u

YOUSEFVAND, Shiba a Farshid HAMIDI, 2020. Role of Paraventricular Nucleus in Regulation of Feeding Behaviour and the Design of Intranuclear Neuronal Pathway Communications. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* [online]. **26**(3), 1231–1242. ISSN 1573-3904. Dostupné z: doi:10.1007/s10989-019-09928-x

YU, Keping, Li LI, Lan ZHANG, Li GUO a Chengjian WANG, 2020. Association between MC4R rs17782313 genotype and obesity: A meta-analysis. *Gene* [online]. **733**, 144372. ISSN 0378-1119. Dostupné z: doi:10.1016/j.gene.2020.144372

14.Přílohy

14.1. Primery použité k NGS

Gen	Sekvence 5´-3´	Sekvence 3´-5´	Délka amplikonu
BDNF	CTAAGCCAGCGCCCGAAAC	CAGCTCTTCTAGTGAGAAGGATTCA	238
BDNF	GGGTCCACACAAACCTCAC	GGCCGGACAGAGGAGC	190
BDNF	AGCCATGATTTACCCAAATGTTC	CTGGTCTCCTCTTTGTTTTGTTT	218
BDNF	AACTGAATAATTTACCCTGTTATGT	CATAGACAAAAGGCATTGGAACT	235
BDNF	ACAATTGCTGGATGTGTCTCCTA	TGAAAGAAGGAAGACTTTACGTAGT	233
BDNF	GCTTTCTAGCCGACCAAACAGAA	GCTGCAGAACAGAAGGAGTACAT	225
BDNF	TGGTCACAACTGAAAATGTTTTGCT	GCCAAGGAGTGAAGGGTTTTAGA	230
BDNF	TCATGTCACTGGCAATGTGGATT	TGACACTCGTATAAGCATGGAGA	235
BDNF	CCCTGGTTTCCTCAAGTCTAGTT	AGTGCCTACATTATCTAACTGTGCTC	231
BDNF	TGTCATGAAAACAATGTGTCTGG	AGAAAAGTTGAGCTTTCTTAGC	187
BDNF	TGTTAAGCAACATGTCAAGATTT	GCGGATATTGCAAAGGGTTATT	231
BDNF	CTGTTTTCTGAAAGAGGACAGTT	ACAGTACAGTGGTTCTACAATCT	220
BDNF	AGTCTTAAAGCAAGGAACACACG	AAACTTAACCGCATCAGAAGCCTA	216
BDNF	ACATAGGTCCTTCCGTCAAAAGC	GAGATGGGGAAAGAATTCCTACAA	226
BDNF	GACTAACCCGAGTCAAGAATCCC	CCAGGAATTGAGACTGAAGTGGAC	238
BDNF	ACTAAGCAACAACTGCAAGTGTAA	AGAGTATCTCTGTGGGAAGAGGA	222
BDNF	TTTTCAGGTGTGAAATGGGCTGA	GGTGCCTTGCTCAATGGAAGAG	236
BDNF	TGGGCCTTTCTAGCTATGTGATG	GGGAGCCCTGAGTTCTAACATAAA	238
BDNF	TTCTGAATGTCCAGACACCTTCC	TGTGGCATTTGTGATCATGAGATT	232
BDNF	GCTTCGAGGGGTGTTCCAG	GCGGGAAGGTGTGTCTGTG	227
BDNF	AGCAGATATTCCAAGCATTCCTTAC	AGGGTGAGGGATAAGCAAAAGAG	233
BDNF	CAGCCTTCATGCAACCAAAGTAT	GTCTGGTGCAGCTGGAGTTTAT	225
BDNF	AAGTTGTGCGCAAATGACTGTTT	ACCATTAAAAGGGGAAGATAGTGGA	226
BDNF	CCCAGAACCCCCAGATTTTAT	TTCACCATGTAAAACAAAAAACAA	222
BDNF	TTGCAAACATCTTCACAACATACA	TTTACTGCTTTTAACTTCTGATAGCG	240
BDNF	GGAAAAGGAACTGTGTTTCTGC	TTCTAAGCATGTTTGCTATTCGT	240
BDNF	CCCCTAAGCCAGTAAAGCAATGA	TTGCATGCTGCTTTAATTGTGAA	233
BDNF	AATTCCACTGAAACGTGGAGGTA	GGATGCAAAAATAACCCGAAGGAC	221
BDNF	CCCCAAAACTCCCACACTCTATT	GCGAACTAGCATGAAATCTCCCT	224
BDNF	CAAGGCCACAGACATTTACTTAC	TCAGTGGCTCTTTTACCCAATAA	239
BDNF	TGGCTTTTTCTGGCTAATACACAC	GGGACTTCCCAGGAAACTTCAAA	216
BDNF	AAAGGCACTTGACTACTGAGCAT	AGAAGCAAACATCCGAGGACAAG	240
BDNF	GGCCTGCCCGAGAGTGT	TAGGCTAGGAATCCTTCCAGGG	239
BDNF	CCCACTACGCAGGTCACAC	TCACGTAAACAGCGAGGTTAGTC	233
BDNF	CCATCCTGTTTTACAGGTAAGGAA	CATGACATTAGCCCCAGGCATAG	216
BDNF	AGAGGCCTTCGTTTTGGAATGTC	TGTAAGCAAAAGGTAGAGCCCTG	216
BDNF	ACAGGTGATGGAAGAAACTGGAA	CATGACTGTGCATCCCAGAAGA	230
BDNF	CGGGGCCTGTCCTCAC	GAGTTGAAAGCTAGGGGAGC	240
BDNF	CTCTCCATGAACAGACAGGATGG	TTGGTAAGGGAAAAGGGAACAGG	234
BDNF	GTCCGGAAAGGACCTTCTACTCC	gctGGATGCTTCTTTCTGGGTTT	231
BDNF	TACAATAGGCTTCTGATGCGGTT	CTTTGTGGCAGAAGTGTTTCAT	226
BDNF	CATGCAGTGTTTCCCCCAAGAT	TGCAAAGGACCATGTTGCTAACT	239
BDNF	GGATCCCCCAGTCAACTCTCTC	GGGCTTTAATGAGACACCCACC	217
BDNF	CCCAACTGCCCTGCTATGTA	CAAGGCGAAGGTTTTCTTACCTG	240
BDNF	CTGCAGCCTTCTTTTGTGTAACC	GATGCTGCAAACATGTCCATGAG	239
BDNF	CGGTGGGTGTCTCATTAAAGCC	TTTGACCAATCGAAGCTCAACCG	227
BDNF	CGAAAGTGTCAGCCAATGATGTC	CTTTCTCCCTACAGTTCCACCAG	225

BDNF	CTCAATGAGGGGACCAAACT	GATAGGAGTCCATTCAGCACCTT	222
BDNF	ATTGATAGTGGAAATTGCATGGC	GCACTAGAGTGTCTATTTCGAGGC	238
BDNF	CCATGTGGCCCATCTGATTGTAA	AAGAAGGAGAACTTGAAGCCACA	232
BDNF	ACAAATTGAAATTCTTTGCTGATGGT	GGGAGCCTGAAATAGTGGTTCTT	236
BDNF	CTCTCATGCTCTCCCTCTACCT	CTAGCGGTGTAGGCTGGAATAG	234
BDNF	CGCTCCCCTAGCTTTCAACTC	TGCGCGAACTCTGTTTAAGCC	216
BDNF	TGCTGGAAGGTAATGTGTCTTGT	TCAAAAGGAAACGTGTCTCTCGG	233
BDNF	ACTGTTCTCCATGCTTATACGAGT	CTCATTCTTTGGGCGTTGGTCAG	216
BDNF	AAGACGCTTTTTAAGGGCGACAC	GTGACAAACCGTAAGGAAGTGGA	232
BDNF	CGCCGTTACCCACTCACTAATAC	GTTCGGCCCAATGAAGAAAACAA	222
BDNF	gcgctaccgATACCCGTTC	CTGGAACACCCCTCGAAGC	208
BDNF	TGTAATCTCCCCTTCTTCTTGCC	AACCCACATCTCTACCCATCCTG	230
BDNF	ATTATCCAGAGGTGGGATGGTGG	TGCGGGAGGAATTTCTGAGTG	240
BDNF	GCATTTCCCAAAGTTAACCCAGT	ACCCTGTGTCGCCCTTAAAAA	217
BDNF	CCATACAGAAGCGTGTGGGTAG	TCCTCCTGCATTAAGCTACAAGT	239
BDNF	CAGAAGACAAAGCAACTGGCATC	ACTCCTCACTTTCTCTGGGAACT	229
BDNF	TCTTCCCCTTTTAATGGTCAATGT	TCCCTGTATCAAAAGGCCAACTG	233
BDNF	ACAAAGAGACCACAGCAAGACTTTA	AACAACCCCCCATCACAAACTTA	238
MC4R	AATTGAAAGCAGGCTGCAAATGG	TAGCCAAGAACAAGAATCTGCAT	224
MC4R	CATGCCTGCTGTGAGTAAATGTC	GCATGGCAGCTTCAAGGAAAAT	223
MC4R	TTATTAAGAACCCAGCCAGTAGT	GCACCTTTTTTCAGCTATAACAC	205
MC4R	ATGGATATTCTCAACCAGTACCC	ATCGATCCTCTGATTTATGCACT	234
MC4R	ACAGTGCCTACAACCTATAACAT	CACGCAATATAGGAACATGCATAA	233
MC4R	CTCACATCGGCTGCCTCTC	GCTTCTGCATCTGAATCTGTGTC	235
MC4R	CTGCTCTTTGCTTTCTTGTTCTC	TCCACACATCATAAAAATCAGCA	221
MC4R	AAGGTAATCGCTCCCTTCATATT	ATAAGTTGTATCTGGGCAGCTT	233
MC4R	AAGTCTGAAGTCGAGAAGCAAGC	AGTATCCTAGCCAAAAAGCAGAGT	229
MC4R	GGTGAAGAACATGGTGATGAGG	GTGATCTGTAGCTCCTTGCTT	228
MC4R	CTATGTTACGAAAGCACGCAAAGT	TGCCCAGTCTCTGTATTATTTCCA	180
MC4R	GCTTCCTTCTGACCAATCCCAAT	GCTGCCTGAAGATAGCTTGTTTT	226
MC4R	CACAAACACCTCAGGAGAGACAA	AGGAAATAACTGAGACGACTCCC	231
MC4R	CATTTGAAACGCTCACCAGCATA	GCAGTTACAGACTGCACAGCAA	237
MC4R	AGACATGGTATGGCTGGAAGAAC	CAGAATGCAGCTTATTATTTTCCTGA	217
MC4R	TGCTCTGTCCCCATTTAATATCT	CCCCATTCTTCCTCCACTTA	238
MC4R	CACGGTGGGTGGAGTTC	AGCCCAAGATTTTAAAGTGATGATG	240
MC4R	AGACATCATGTGTGTGTGTAAAATGA	ACATAGTTCTTCCAGCCATACCA	218
MC4R	CATGAAGCACACACAATATGGAT	TTCTCTCTATGTCCACATGTTCC	217
POMC	GAGACGTCCTCGCGCTTC	CACGGGCTGCCCTCAT	227
POMC	CCAAACTATCTGATCCCTCGAA	TAAAGCTGCCTGTAGTTAGGAAA	238
POMC	ATGGCAGGATTTGAAGAGGATGC	CCACCTGGTTAAGGGAAATTTGG	240
POMC	CTTCTTGCCCACCGGCTT	AAGTACGTCATGGGCCACTTC	234
POMC	GGACGGGGACAGGGGAT	CTGCCGGGAAGGTCAAAGTC	218
POMC	AGAGCAAGGGGCTTTGGG	GTGGCGGCCGAGAAGAAG	236
POMC	CAGCTCCAGTCCCATCTAATGTC	CCCACCAATCTTGTTTGCTTCTG	232
POMC	CTCTTCTTCCCCTCCTTCGC	CGCCTTCGGCAGGACAG	232
POMC	TCAAAGTCAGAGGTGGATGTGAAA	GCTGTTCAAAAACGCCATCATCA	228
POMC	CGTCGGGGCCATCTCC	CCCCGCAGCGATGGTG	211
POMC	GGGAGACGCGCTGGAAAG	TATTTACCGCCAAATGCGAACC	240
POMC	CAGCGGAAGTGCTCCATCC	GGCGCCCAGTGAAGGTG	223
POMC	AGGTTGCTTTCCGTGGTGAG	AATGTTGGCTCAAGGTCCTTCCT	234
SIM1	CTGTCCTCTTGCGAGGGATTTA	GCGCCTGCATTCATCCT	240
SIM1	TTGAAACCACAAAGAAGTCAGTTT	ATTGCATTGTGACTATCCAGTGA	224

SIM1	TTTAAAGTAGGTATGGCAGGTGA	TGCCAAATGTTGAGAAACATGAA	217
SIM1	CCATCTCTTAACTGTTCTCATGC	GGAATAATAGTGAACTGGCTTCG	227
SIM1	CCCAAAATGGTCAAATGCTCAAT	ATACAAGATTTCCGCCCTCAAGA	218
SIM1	GCTTTCCTTAGCTGTAATCTGTT	AGGGTGAATTCTGAGATCACTTA	237
SIM1	TGAGGATCACTGGATAGTCACA	ACATAGCACTAGCATTCAGGGTT	196
SIM1	GTCATCAAATGTCTTAACTTACCT	AGATTGACCCAGTTTTAAGTACA	185
SIM1	CAATGTCACTAAAAACTATACATTGC	AAGAAATGAAATTGGCCTGGAAA	240
SIM1	ATTGAGCCTAGTATCTGAAGTGT	GACATCAGTGACCAGAGAAATG	225
SIM1	ACTTTCAATTAGAGATCATATTTGGC	GATACCCTGAACGACCCTC	226
SIM1	AGCAAAGTTGCAATAAACAAAACT	CTCAGAGTTCCTTCTCTAGGAC	240
SIM1	AAACCACACATAAGTGAATCTGC	ATAGGTAGGTGACAATCTGAACG	230
SIM1	TCAAGTTCTGCCAGTACATTCCC	GCTCCTTTAGGCAGGTTACAGTT	229
SIM1	AGCACTATCTGTACAACCCTTAC	TTATGTAAATGTCAAGTTTTTGTGAA	231
SIM1	TTCACTGTTTTCCTTCTCCCTCC	GCTGGTCTTTTACTGCCATCAAT	229
SIM1	ATCTTTCTGTGTGAAATCCCGAA	AAAGGATTTTCTTTGGAAGCATCATA	240
SIM1	ATCATTATGAAAACAGGATGTATGT	TTCAGTGCAATCTATCAGTCCTA	233
SIM1	ACCCAGTACTCATCTTTCATATT	GCCCAAAACTCTTGCCATATTTA	186
SIM1	CTGCGGTCCGAAAACTGTC	GCTGTTTTTTGTTTGTTTGTTTTCTC	239
SIM1	TGGTCACCCCTTGGTATAAACAG	CCAATCAAATGCAGATAAAAAACCCA	180
SIM1	TGAAGTGTCTACTCATAATGTTTCC	TAAATCTATATGGGGTTGGGGTT	217
SIM1	TCCACAATTAGTTCCACAGTAAG	ATAAAATGTTTGAATGCCCAGAT	222
SIM1	CTCCTGCTGTCTGATGAGGAGAT	CCCACCAACAGGTGAAGTCTG	233
SIM1	TTCTCAGGATCTATTTGCCAACC	TGAACAAGTATGCCTGAATTTACT	240
SIM1	TATCACAGAACATGAACGCTGGG	gctaagagcAGTACTCTGAAGGAA	237
SIM1	CGATGGAAACAATCTAGCCCTAT	TTAATGTCACAATCACTACAGGT	234
SIM1	CTGAGGAGCCAGCCTTTT	GTTTTTGGAATTGGGACGAGTG	237
SIM1	ACAGAGTCAAAGAAAATTACCCA	CCTCTAATTATATGGGAACCAGAA	238
SIM1	ACTCAAAGTGCATATTGGTAACT	TGCAATGTATAGTTTTTAGTGACAT	238
SIM1	TTCTACAAAACCTTTAGCATTCTT	GGACTTGAGTATGTGAGAATTTGA	229
SIM1	AGAGCTAAAATGGTTCCTGTTTCT	TGATATCTTGCAAAGTGTTCCCA	238
SIM1	GTGAAAAATTACCTCTTCCTGATTGT	TCTTTGACTCTGTCACACTAAACT	218
SIM1	TGGCAAAGTTATGGAAATCAAGAAT	TGACCCAAGGTAAGTTAAGACATTTG	239
SIM1	TCTATCCACACCTGGCAAAAAA	CCTCCCCATCAATACTTTCTCTT	216
SIM1	TTCAAACCATGTCGCCAAAAA	CCCTGCAGAGACACAGAATACAA	229
SIM1	TCTCTCTGCTGGATATGGTCACA	CCACATGAACCCAGCAAAATTGA	239
SIM1	AGCATTATTCCTTCTGATTACTCTCA	TCACAGATGGGTATTTCTGGTGG	220
SIM1	AAATGGGAACACTTTGCAAGATA	ATGAGTAGACACTTCAAAAAAGATAA	236
SIM1	AGTTACAGGTAGGGCCAAAATTA	CATATGTGCCAATGTGACAAC	231
SIM1	TATAATTGATCCTCATCCCCCAT	TTACACAGAAAAACCACTTGCTC	216
SIM1	CCCCCTACCCCTGCTTCC	CACTAACTTCTGTCCTCCTGCTC	236
SIM1	TTTCAGCAAAACATCAGCTTCCG	CTCTCCAAACTGCTTTGGCTCTC	233
SIM1	GCCATATTGCAAAAAATGTAAGC	TGCTCTTTAAAATGACATGACCA	218
SIM1	CAGGCACTCAGACCCTCAAAG	GGCACTCGGGTAATACAGTCG	227
SIM1	ATCATATTTTTCTGTGTGCGTAT	AATGAATGACAACAGTTATGGAC	227
SIM1	CCTGTGGCGCTCACTTATACAAA	TGCTGTAAATGCAAAAAAGTGCAA	227
SIM1	GTTTCAGAATCTGCGAATGTCTT	TTTTGTCCAGTAAAAACCAGGAG	238
SIM1	GTAGTCCCAGAGGTAGGGACATT	GTGTCACACGACCTGAGCTTC	222
SIM1	TTACCTGAGGGTATGGGGAAGTC	TTCCTATGGTGGCTGATTAAGGG	217
SIM1	TTGATGTGTGTCCCAATATCTCA	AAACTGACTTCTTTGTGGTTTCA	233
SIM1	CTGGATCATGAATTGGAGGAGGG	GCTTGTGAGTGGCATTGAGGG	236
SIM1	TAAATCTTGCTATTTTTCTTCTCTGT	CTGTGATAGAGCAGAACTGAACTTA	216
SIM1	TCAGAAGATTTCTTTATCTGTGCT	TGGGCAGAGAATCCCACTTA	225

SIM1	GCAAAGTCACTTACCTTCTGGGA	GCGGAGCTTAAGTTGTGAGAAGA	230
SIM1	ACTTAAAACTGGGTCAATCTACCA	AAGAACCAGGGAAAATGAACTGA	239
SIM1	GTCAAAATTTATCTATTCTGGTTCCC	AGTTTAATACCCCATTACCAGCA	204
SIM1	GCCTCTCCCACACCACC	TTCATGATCCAGAAAAGGGAGCC	221
SIM1	CTTTCTGGGGAGGCCTTTGT	CTGGCTCCCAGCACGAC	238
SIM1	GTCATGTGGCACTTCACTGGT	CCTGGAGTGCTCAATTGGAAGTA	228
SIM1	GGACATAGTTGACGCTGACGATA	TCTTACCACCAGGGATTGCATTT	223
SIM1	GCCACGACTAATTGGGGAAAAAC	GTCCCTTCACCGGGCATTC	239
SIM1	CTCATTTTGAATGTCACCTCAGC	GAAGTTTCCCCAATCTTTCTTGG	229
SIM1	AAACATTTTGCCTATTCCTTCAGAG	TCAAACCAATTCACCCAGAAAAAAG	229
SIM1	GTGAGGACCTTAGTGAAGCAG	GGACAAAGCATCCATAATCAGAC	220
SIM1	CCAGAAAGATGAGCTTCATGTCC	CTCTTCCTACCTGTGGCTGAGT	240
SIM1	CAAGAACAGTGTATTGATGGCAGT	TATGTCGATTTTCCGAGGACCAG	234
SIM1	TATCTGACCTGTAGTGATTGTGA	ACATAGCTCATGGTTTTGTAGAAT	229
SIM1	ATGCTGAGCCCTTAAATTGTGTT	GAGGTAATTTTTCACCTTGCTTTTCA	216
SIM1	GCCCGAGCCTTGTCTAACC	GACCACCAAGTACTACAGGTTCC	226
SIM1	CTGCTTAAGTCACAAAGCATCTA	TAATTTTGGCCCTACCTGTAACT	221
SIM1	TGGGCTCATAGGATAGACGGAAA	CTTCGACGGCTGCTACCAAAAC	233
SIM1	AACCTGCCCAGGGCCTAAT	GTGAGGCAGGCAGGTACTTC	210
SIM1	AACCCTGAATGCTAGTGCTATGT	ACAAGGACACAAGGGAACATCTG	220
SIM1	AGCACATTTTTATGTATCCCCAA	GTGCAGCAACATATTTCCTCATA	225
SIM1	CCATTTCTTTTAGCTTCTGTCCC	TGGAATACATAAAATGGAGTTTTGA	216
SIM1	GTTACCGGGTGTAAGTTTAACAG	CAATTATAACACACACACACACA	240
SIM1	AGTTTCTAATGGTTTCGCTGTCAT	GCACTATCTCGGATAAGTAGTCCC	229