

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA



Autoreferát disertační práce

Role genu pro FTO v genetické determinaci „civilizačních“

onemocnění

Dana Dlouhá

Praha, 2013

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: Prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc

Školící pracoviště: Institut klinické a experimentální medicíny v Praze

Autor: Mgr. Dana Dlouhá

Školitel: Ing. Jaroslav Hubáček CSc., DSc

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE

FACULTY OF SCIENCE



Summary of the Ph.D. Thesis

**The role of the *FTO* gene in the genetic determination of common
multifactorial diseases**

Dana Dlouhá

Prague, 2013

Doctor study program in biomedicine

*Charles University in Prague
and the Academy of Sciences of the Czech Republic*

Program: Molecular and cellular biology, genetics, and virology

Chair of the specialty committee: Prof. RNDr. Stanislav Zdražil, DrSc

Training place: Institute for Clinical and Experimental Medicine in Prague

Author: Mgr. Dana Dlouhá

Educational supervisor: Ing. Jaroslav Hubáček CSc., DSc

The thesis is accessible in the relevant libraries of the Faculty of Science of the Charles University in Prague.

ABSTRAKT

Obezita je rizikovým faktorem rozvoje mnoha civilizačních onemocnění. Mezi tato onemocnění s nejvyšší úmrtností patří kardiovaskulární onemocnění (KVO), diabetes mellitus 2. typu (DM2), některá nádorová onemocnění a nemoci pohybového aparátu. Jedním z genetických rizikových faktorů determinujících tělesnou hmotnost je gen pro FTO („fat mass and obesity associated protein“). Má práce zahrnuje tři publikované prvoautorské články, jeden prvoautorský rukopis a sedm článků, jejichž jsem spoluautorkou.

První část je zaměřena na detekci rizikových alel vybraných polymorfismů genu *FTO* a jejich korelaci s BMI u české populace. Nepotvrdili jsme souvislost varianty v prvním ani ve třetím intronu s BMI u české kontrolní populace. Intervenční studie ukázaly souvislost se změnami BMI u obézních dětí, ale ne u žen.

Ve druhé části jsme se zaměřili na analýzu vztahu varianty v 1. intronu genu pro *FTO* a rizikem infarktu myokardu/ akutního koronárního syndromu (IM/ AKS), renálním selháním (ESRD) a výskytem kolorektálního karcinomu (CRC). U pacientů s AKS jsme našli korelaci mezi rizikovou alelou a zvýšeným rizikem tohoto onemocnění (OR 1,49). U pacientů s ESRD jsme detekovali souvislost mezi onemocněním a přítomností rizikové alely (OR 1,37). U pacientů s CRC jsme souvislost s *FTO* variantou nepotvrdili. Jako kontroly byly použity reprezentativně vybrané soubory české populace „MONICA“ a „HAPPIE“.

Ve třetí části jsme v rámci analýz potencionálních mechanismů vlivu polymorfismu rs17817449 detekovali souvislost s relativní délkou telomer (rTL) u pre- a postmenopauzálních žen z Prahy (3PMFs).

Ve čtvrté části jsme sledovali rozdíl v expresi genu *FTO* u jedinců s odlišným genotypem. Přesný mechanismus účinku *FTO* není dosud znám, nicméně *FTO* vykazuje DNA demetylázovou aktivitu. Zajímalo nás, zda globální metylace DNA u vybraných jedinců bude korelovat s odlišným *FTO* genotypem nebo hladinou exprese *FTO* genu.

Poslední, pátá část disertační práce je věnována konfirmační studii vybraných polymorfismů *FTO* (rs17817449, rs2302673, rs17818902) s rizikem vzniku závislosti na tabáku či alkoholu u české populace. Souvislost mezi variantou rs1558902 a počtem krevních destiček jsme analyzovali u žen z 3PMFs studie

ABSTRACT

Obesity is a risk factor of development of many civilization illnesses. The obesity-related conditions with highest mortality include cardiovascular disease (CVD), type 2 diabetes mellitus (DM2), some types of cancer, and musculoskeletal system diseases. One of the genetic risk factors determining body weight is the *FTO* gene („fat mass and obesity associated protein“). This thesis includes three published papers where I was the first author, one manuscript where I was the first author, and seven papers that I co-authored.

The first part focuses on the detection of high risk alleles of selected polymorphisms of *FTO* gene and their correlation with BMI in the Czech population. We did not confirm the association of the first and the third intron with BMI in the Czech control group. Interventional studies suggested association with change in BMI in obese children, but not in women.

The second part is focused on the analysis of the relationship between the 1st intron *FTO* gene variant and the risk of myocardial infarction or acute coronary syndrome (MI/ ACS), renal failure (endstage renal disease, ESRD) and the occurrence of colorectal cancer (CRC). In patients with ACS we have found correlation between the risk allele and increased risk of this disease (OR 1.49). In ESRD patients, we have detected association between the disease and the presence of risk allele (OR 1.37). In CRC patients, we did not find association with *FTO* variant. The control groups were selected cohorts representative of the Czech population, derived from „MONICA“ and „HAPIEE“ studies.

In the third part we have analyzed potential mechanism of polymorphism rs17817449 to detect association with relative telomere length (rTL) in pre- and postmenopausal women living in Prague (3PMFs study).

The forth part focused on the difference between *FTO* gene expression in individuals with various genotypes. The precise mechanism of action of the *FTO* gene is not known so far, however, *FTO* expresses DNA demethylase activity. We attempted to find out whether DNA methylation in selected individuals will correlate with different *FTO* genotype or different level of *FTO* gene expression.

The final, fifth part of the thesis is focused to confirmatory studies of selected *FTO* polymorphisms (rs17817449, rs2302673, rs17818902) with the risk of development of substance dependency to tobacco or alcohol in the Czech population. The relationship between rs1558902 variant and blood platelet count was analyzed in women from 3PMFs study.

ÚVOD

Díky celogenomovým screeningům (GWAs – „genome wide association study“) bylo možné detekovat nové, dosud neznámé asociace fenotypu s DNA variantami. GWAs studie odhalily potenciální vliv celé řady nových genů na determinaci BMI. Příkladem mohou být geny pro INSIG2 (insulin-induced gene 2), MC4R (melanocortin-4 receptor gene) nebo dosud nejsilnější známý genetický determinat hodnot BMI, gen pro FTO („fat mass and obesity associated“ gene) [Hainer a kol. 2008, Marinou a kol. 2010, Bogardus a kol. 2009].

FTO varianty v prvním (a v některých populacích i ve třetím) intronu tohoto genu jsou spojeny s hodnotami BMI a přítomnost jedné rizikové alely je spojena s nárůstem tělesné hmotnosti o 1,5 - 2 kg [Loos a kol. 2008, Dina a kol. 2007, Frayling a kol. 2007]. Studie sledující možnou kauzalitu (vliv jednotlivých variant na energetický příjem, bazální metabolismus, fyzickou aktivitu) nepřinesly konzistentní výsledky.

Gen pro FTO

Experimentální studie

FTO (dříve známý pod názvem Fatso) byl poprvé popsán [Peters a kol. 1999] u myši jako jeden ze šesti genů uvnitř rozsáhlé delece na chromozómu 8, odpovědných za *Ft* (fused toes – „srůstání prstů“) fenotyp [Boissel a kol. 2009].

Studie na hlodavcích prokázaly nejvyšší hladiny *Fto* mRNA v mozku a hypotalamu, při hladovění nebo přejídání byla exprese *Fto* regulována a vykazovala tkáňově specifické odlišnosti [Peters a kol. 1999, Loos a kol. 2008, Dina a kol. 2007, Frayling a kol. 2007].

Charakteristika lidského genu pro FTO

FTO obsahuje 9 exonů o celkovém rozpětí více než 400 kb, je lokalizován na lidském chromozómu 16 v pozici 16q12.2. Kódovaný protein se skládá z 505 aminokyselin (NCBI Reference Sequence: NP_001073901.1, OMIM ID 610966). Většina funkčně zajímavých polymorfizmů (cluster asi 40ti SNPs) je lokalizovaná v prvním intronu v oblasti s mezidruhově silně konzervovanou sekvencí [Loos a kol. 2008]. *FTO* je exprimován ve všech lidských embryonálních a dospělých tkáních, nejvyšší hladina exprese byla zjištěna

v mozku, hypotalamu a játrech [Boissel a kol. 2009]. Funkce FTO *in vivo* je v detailu neznámá, ale FTO sdílí sekvenční motivy s Fe²⁺ a 2 - oxoglutarát - dependentními oxygenázami [Fawcett a kol. 2010]. Rekombinantní FTO katalyzuje demetylací 3-methylthyminu ssDNA a s nižší účinností 3-methyluridinu v ssRNA *in vitro* [Gerken a kol. 2007]. FTO může působit i jako transkripční koaktivátor [Wu a kol. 2010].

Polymorfizmy v genu pro FTO a jejich role v determinaci BMI

V roce 2007 se objevily tři práce [Dina a kol. 2007, Frayling a kol. 2007, Scuteri a kol. 2007], popisující asociaci variant v genu pro FTO a BMI. Primárně byly sledovány tři varianty rs9939609 (T/A), rs1421085 (C/T) a rs17817449 (G/T). Alely A (rs9939609), C (rs1421085) a G (rs17817449) byly silně spjaty s fenotypem obezity. Jak se později ukázalo [Hubacek a kol. 2009], tyto varianty jsou v silné vazebné nerovnováze. U bělošských populací má alespoň jednu rizikovou alelu přibližně 60 % populace, okolo 20 % je nositelem dvou těchto alel [Loos a kol. 2008, Dina a kol. 2007, Frayling a kol. 2007, Scuteri a kol. 2007]. Existují významné mezi-etnické rozdíly jak ve frekvencích alel, tak v míře nalezené vazebné nerovnováhy. [Bollepalli a kol. 2010, Lopez – Bermejo a kol. 2008, Liu G a kol. 2010, Rendo a kol. 2009, Demerath a kol. 2011, Liu Y a kol. 2010, Cheung a kol. 2010, Adeyemo a kol. 2010]. GWA analýza izolované populace Lužických Srbů detekovala varianty v oblasti intronu 3 jako další a na intronu 1 nezávislé prediktory hodnot BMI. Kombinace alel C a G u SNPs rs10521308 a rs17818902, spojená s nižším průměrným BMI, se vyskytuje přibližně u 18 % populace [Tönjes a kol. 2010].

Mutace

Mutace deaktivující *FTO* se vyskytují jak u obézních, tak u štíhlých jedinců, nemají tedy přímou souvislost se vznikem obezity jako takové. Jedna z mutací, inaktivujících *FTO*, byla zmíněna ve spojitosti s autozomálně recesivní determinací úmrtnosti [Boisel a kol. 2009, Meyre a kol. 2010].

Asociační studie a vybraná onemocnění

Primárně byl gen pro FTO detekován pomocí GWAs studie zaměřené na analýzu genetických dispozic k diabetes mellitus 2. typu (DM2) [Frayling a kol. 2007, Legry a kol.

2009, Scott a kol. 2007, Burton a kol. 2007]. Souvislost mezi *FTO* a DM2 je částečně, ale ne zcela, vysvětlována vyššími hodnotami BMI. Doney a kol. [2009] navíc ve své studii zjistili, že větší množství tukové hmoty u nositelů alely A (rs9939606) souvisí s vyšším aterogenním lipidovým profilem a rizikem vzniku infarktu myokardu (IM). Lappalainen a kol. [2011] zjistili, že polymorfismus rs9969609 *FTO* může přispívat k rozvoji KVO u mužů s abnormálním metabolizmem glukózy. Studie sledující výskyt KVO u zdravých žen bělošského původu zjistila vyšší riziko KVO u žen s A alelou a současně s nižší pohybovou aktivitou [Ahmad a kol. 2010]. Bylo publikováno několik studií sledujících souvislost mezi *FTO* polymorfismem (rs9939609) a výskytem nádorových onemocnění [Brennan a kol. 2009, Gaudet a kol. 2010, Lurie a kol. 2011, Lewis a kol. 2010, Nock a kol. 2011]. Existují studie, které se zabývají spojitostí mezi variantami v genu pro *FTO* a: syndromem polycystických ovarií [Asunción a kol. 2000, Legro a kol. 2000, Barber a kol. 2008, Attaoua a kol. 2008], hladinou exprese *FTO* v placentě, porodní hmotností a délkou dětí [Bassols a kol. 2010], úmrtností [Zimmermann a kol. 2009, Sonestedt a kol. 2011], rozvojem závislosti na tabáku a na alkoholu [Bierut a kol. 2007, Sobczyk – Kopciol a kol. 2011], redukcí objemu frontálního laloku mozku a rozvinutí Alzheimerovy choroby [Ho a kol. 2010, Benedict a kol. 2011, Keller a kol. 2011].

CÍLE PRÁCE

I. Prvním úkolem předkládané disertační práce bylo zjistit, zda *FTO* varianty v 1. a 3. intronu *FTO* genu souvisí s hodnotami BMI u vzorku české populace „MONICA“ a zda korelují se změnami BMI během intervenčních studií u žen a u dětí.

II. Druhým úkolem předkládané práce bylo zjistit, zda existuje souvislost mezi *FTO* variantou rs17817449 a rizikem rozvoje některých civilizačních chorob v české populaci.

III. Třetí část této práce jsme zaměřili na sledování souvislosti mezi *FTO* polymorfismem rs17817449 a relativní délkou telomer měřenou v leukocytech periferní krve.

IV. Čtvrtým úkolem disertační práce bylo zjistit, zda odlišný genotyp varianty rs17817449 *FTO* genu souvisí s hladinou mRNA *FTO* v jaterní tkáni a analyzovat celkový stav metylace DNA u vybraných skupin jedinců s odlišným genotypem této varianty.

V. Poslední část disertační práce je věnována konfirmační studii vybraných polymorfismů *FTO* (rs17817449, rs2302673, rs17818902) s rizikem vzniku závislosti na tabáku či alkoholu u české populace. Souvislost mezi variantou rs1558902 a počtem krevních destiček jsme analyzovali u žen z 3PMFs studie.

MATERIÁL A METODIKA

Analyzované soubory

MONICA – populační studie *Multinational monitoring of trends and determinants in cardiovascular diseases*, 2559 nepřibuzných jedinců bělošské populace (1 191 mužů, 1 368 žen ve věku 25 – 65 let). Během let 1997-1998 byli vyšetřeni jedinci z 9 okresů České republiky a znovu v letech 2000 - 2001 dle WHO protokolu [Cífková a kol. 2010, Tunstall-Pedoe a kol. 2003].

Czech HAPIEE – populační studie *Health, alcohol and psychosocial factors in Eastern Europe*, 6 827 vybraných jedinců z registru populace ze 7 českých měst (45 % mužů, 45 - 69 let), vzorky sbírány v letech 2002 - 2005 [Peasey a kol. 2006].

107 žen bez anamnézy diabetes mellitus (BMI > 27,5 kg/ m², věk 49,2 ± 12,3 let).

357 obézních nepřibuzných dětí (věk 13,7 ± 4,9 let, BMI 30,8 ± 4,6 kg/ m²).

1 092 mužů s akutním koronárním onemocněním, vzorky shromážděny v letech 2006 - 2009 v rámci studie **GENDEMIP** (*GENetic DEtermination of Myocardial Infarction in Prague*) z celkem pěti spolupracujících koronárních jednotek na území Prahy [Pitha a kol. 2007].

1 014 hemodialyzovaných pacientů (56 % muži, věk 66,9 ± 12,7, hypertenze 63 %, diabetes 39 %, BMI 26,2 ± 5,0 kg/ m²) z celkem 27 center v ČR.

1 251 pacientů (95 % muži, věk 47,2 ± 13,0), kteří podstoupili transplantaci ledvin, kvůli CKD nebo renálnímu selhání v Institutu klinické a experimentální medicíny v letech 1999 - 2007 (prevalence léčených hypertoniků 82 %, diabetiků 35 % a průměrná hodnota BMI = 25,5 kg/ m²).

1 005 dospělých pacientů s kolorektálním carcinomem - 583 mužů, 422 žen, věk $61,2 \pm 11,0$ let [Jiraskova a kol. 2012].

908 žen, účastnicích se **3PMFs** (*The Prague Pre and Post Menopausal Females study*) - reprezentativní a náhodně vybraný vzorek (5 %) z 29 440 žen ve věku 45 - 54 let, z registru zdravotních pojišťoven, žijících na území Prahy. Ze vzorku 1 472 žen, 908 dalo souhlas s vyšetřením ke studii. [Cífkova a kol. 2008, Pitha a kol. 2007 a 2013].

201 pacientů s alkoholickou cirhózou jater.

25 vzorků **po jaterní resekci**.

11 dobrovolníků z řad zaměstnanců CEM.

Použité metody

Izolace DNA

Genomová DNA byla izolována z plné krve mírně modifikovanou metodou dle protokolu Miller a kol. [1988].

***FTO* genotypizace**

FTO polymorfismy byl stanoveny pomocí PCR a následnou restrikční analýzou [Hubacek a kol. 2008 a 2009].

Expresse *FTO* v jaterní tkáni

RNA byla izolována pomocí RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany) a purifikována pomocí RNase-Free DNase Set (Qiagen, Germany). Jednotné množství RNA bylo reversní transkripce přepsáno do cDNA (Thermo Scientific Verso™ cDNA Synthesis Kit). Pomocí qPCR a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metody byly stanoveny hodnoty mRNA *FTO*. Jako endogenní kontrola byl použit housekeeping gen *GAPDH*. Hladiny mRNAs byly kvantifikovány pomocí primerů a duálně značených prob navržených firmou Sigma Aldrich.

Analýza délky telomer

Relativní délka telomer byla stanovena pomocí kvantitativní polymerázové reakce (qPCR) dle Cawtona a kol. [2002]. Hodnota rTL je určena jako poměr repetitivních telomerových sekvencí k počtu kopií single-copy genu (SCG - ribosomální fosfoprotein PO (36B4) T/S ratio. Množství telomerových repetitivních a SCG kopií jednotlivých vzorků jsme stanovili

komparativní kvantifikační analýzou (Rotor-Gene 3000 software, Corbett Research Ltd). [Cawton 2002, Salpea a kol. 2008]. Reprodukovatelnost měření rTL byla ověřena intra- a inter- assay testy. Průměrné hodnoty variačního koeficientu intra assaye se pohybovaly mezi 1,9 - 6,9 % a inter assaye mezi 3,4 - 14,8 %.

Stanovení celkové DNA metylace

Ke stanovení metylace jsme použili MethylFlash™ Methylated DNA Quantification Kit Colorimetric (Epigentek Group Inc., Farmingdale, NY, USA.). Množství metylované DNA (5 - mC) je úměrné naměřené intenzitě OD vzorku. Množství a počet procent 5 - mC v celkové DNA jsme stanovovali pomocí absolutní kvantifikace.

KOMENTÁŘ K VÝSLEDKŮM A DISKUZE

Vlastní výsledky práce *in extenso* jsou obsaženy v uvedených pracích.

I. Zaměřili jsme se na replikaci nálezu Tönjes a kol., kteří pomocí GWA u izolované populace Lužický Srbů našli nezávislý *FTO* signál v oblasti intronů 2/3. Nejsilnější vliv na BMI byl zjištěn u varianty rs17818902. Analyzovali jsme skupinu jedinců z projektu „MONICA“ Navíc jsme analýze podrobili 556 studentů VŠ z Českých Budějovic a okolí. Ačkoliv frekvence jednotlivých genotypů byly v Hardy-Weinbergově rovnováze ($P = 0,49$) a nelišily se mezi českou a srbskou populací, nepotvrdili jsme souvislost mezi variantou rs17818902 a hodnotami BMI. [Dlouha D, Adamkova V, Lanska V, Hubacek JA. Lack of association between a new tag SNP in the *FTO* gene and BMI in Czech-Slavonic population. Eur J Hum Genet. 2010;18(12):1274]

Dále jsme sledovali *FTO* polymorfismy rs17817449 (1. intron) a rs17818902 (3. intron) během krátkodobé intervenční studie u žen bez anamnézy diabetes mellitus. Průměrný úbytek váhy byl $4,8 \pm 3,5$ kg ($5,3 \pm 3,5$ %, maximum - 15,5 kg a minimum + 2,0 kg, $P < 0,01$). Souvislost mezi sledovanými variantami a poklesem BMI jsme však nenalezli. [Dlouhá D, Suchánek P, Lánská V, Hubáček JA. Body mass index change in females after short-time life style intervention is not dependent on the *FTO* polymorphisms. Physiol Res. 2011;60(1):199-202.]

Souvislost výskytu polymorfismů genu *FTO* (rs17817449) a *MC4R* (rs17782313) s poklesem tělesné hmotnosti jsme sledovali u obézních nepříbuzných dětí během 4týdenní intervenční studie. Sledovaní jedinci měli optimálně dle věku redukováný energetický příjem a každodenní cvičební program. Průměrný úbytek váhy činil $6,2 \pm 2,1$ kg ($P < 0,001$). Nalezli jsme statisticky významnou souvislost mezi poklesem BMI dětí a sledovanými polymorfismy obou genů. Nositelé *FTO* varianty GG a/nebo *MC4R* CC varianty vykazovaly vyšší úbytek váhy než ostatní jedinci ($P < 0,0009$ pro BMI, $P < 0,002$ pro tělesnou hmotnost). Tyto rozdíly zůstaly významné i po adjustaci k pohlaví, věku a vstupním hodnotám ($P = 0,004$ pro BMI a $P = 0,01$ pro tělesnou hmotnost). Naše studie ukázala, že varianty *FTO* a *MC4R* genů ovlivňují výsledný pokles BMI u obézních dětí během intenzivní intervenční studie. [Zlatohlavek L, Vrablík M, Motykova E, Ceska R, Vasickova L, Dlouha D, Hubacek JA. FTO and MC4R gene variants determine BMI changes in children after intensive lifestyle intervention. Clin Biochem. 2013;46(4-5):313-6.]

II. Analyzovali jsme variantu rs17817449 u mužů s **akutním koronárním syndromem (AKS)** ze studie „GENDEMIP“. Kontrolní vzorek tvořili muži z projektu „MONICA“. Pacienti s AKS byli starší, bylo mezi nimi více kuřáků, pacientů s DM a s hypertenzí než v kontrolní skupině. Hodnoty BMI pacientů se nelišily od kontrol. Hladina celkového cholesterolu byl překvapivě nižší u pacientů s AKS i po vyloučení pacientů s hypolipemickou terapií. Frekvence genotypů v české populaci odpovídala frekvencím v jiných evropských populacích. Analyzovaná varianta významně souvisela s BMI jak u pacientů ($P < 0,01$), tak u kontrolní populace ($P < 0,02$). Nejvyšší BMI měli homozygoti pro G alelu a nejnižší TT homozygoti, a to v obou sledovaných skupinách. Frekvence GG genotypů u pacientů s AKS se významně lišily od frekvencí kontrolní populace (21,4 % vs. 15,9 %, $P < 0,005$). Nositelé *FTO* varianty GG vykazovali významně vyšší riziko onemocnění AKS v porovnání s TT jedinci. Riziko bylo nezávislé na věku a BMI (OR 1,49, 95 % interval spolehlivosti 1,16 - 1,93). Zvýšené riziko AKS pro GG genotyp zůstalo i po vyloučení diabetiků ze studie (100 kontrol, 339 pacientů AKS) OR 1,32 (95 % CI 1,01 - 1,72). [Hubacek JA, Stanek V, Gebauerová M, Pilipincová A, Dlouhá D, Poledne R, Aschermann M, Skalická H, Matoušková J, Kruger A, Penicka M, Hrabáková H, Veselka J,

Hájek P, Lánská V, Adámková V, Pítha J. A *FTO* variant and risk of acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta*. 2010;411(15-16):1069-72.]

Provedli jsme dvě nezávislé studie na pacientech s **chronickým onemocněním ledvin (CKD)/ selháním ledvin (ESRD)** České republiky, u kterých jsme sledovali variantu rs17817449. V prvním případě jsme analyzovali hemodialyzované pacienty. Jako kontrolní soubor byl použit soubor jedinců z „post - MONICA“, bez CKD či renálního selhání. Ve druhé studii jsme analyzovali pacienty po transplantaci ledvin s anamnézou CKD či renálního selhání. Jako kontrolní skupinu jsme použili dobrovolníky z české studie „HAPIEE“. *FTO* genotyp souvisel u obou kontrolních skupin s BMI. Frekvence *FTO* genotypů se významně lišily mezi pacienty a kontrolní skupinou v obou studiích. Riziko onemocnění (OR) CKD či selhání ledvin se zvyšovalo s výskytem alel G. V prvním případě bylo OR renálního selhání či CKD pro jedince s GG genotypem v porovnání s homozygotem TT 1,56 (95 % CI 1,27 - 1,96) a trend vzrůstajícího OR se zvyšujícím se počtem alel G byl vysoce významný ($P = 0,00004$). Výsledky druhé studie byly podobné, OR renálního selhání či CKD pro GG genotyp vs. TT genotyp bylo 1,27 (95 % CI 1,07 - 1,51, $P = 0,006$). Frekvence *FTO* genotypů obou skupin pacientů ani kontrolních skupin se významně nelišily ($P = 0,60$, resp. $P = 0,07$). Když jsme obě studie spojili, pro CKD/ renální selhání bylo OR pro GG genotyp vs. TT genotyp 1,37 (1,20 – 1,56, $P = 0,000011$). Po adjustaci k věku a pohlaví se tyto hodnoty téměř nezměnily: OR 1,34 (1,16 – 1,54) resp. OR 1,13 (1,00 – 1,47). Navíc jsme zjistili, že jak u hemodialyzovaných pacientů s GG genotypem, tak u transplantovaných pacientů nastupuje onemocnění přibližně o 3 roky dříve než u pacientů s TT genotypem. [Hubacek JA, Viklicky O, **Dlouha D**, Bloudickova S, Kubinova R, Peasey A, Pikhart H, Adamkova V, Brabcova I, Pokorna E, Bobak M. The *FTO* gene polymorphism is associated with end-stage renal disease: two large independent case-control studies in a general population. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(3):1030-5.]

Rozhodli jsme se zjistit, zda výše sledovaná varianta rs17817449 genu *FTO* koreluje s výskytem **rakoviny tlustého střeva, kolorektálním karcinomem (CRC)**, v české populaci. Je známo, že Česká republika se vyznačuje celosvětově nejvyšším výskytem CRC. Analyzovali jsme rozsáhlou skupinu dospělých pacientů. Jako kontrolní populaci jsme

použili jedince ze studie „HAPIEE“. Frekvence genotypů mezi pacienty s CRC a zdravými kontrolami se významně nelišily pro dominantní ($P = 0,31$), kodominantní ($P = 0,78$) ani recesivní ($P = 0,85$) model. [Hubacek JA, Dlouha D, Bobak M, Jiraskova A, Vitek L. The risk of sporadic colorectal cancer development is not influenced by fat mass and obesity related gene polymorphism in Slavs. Eur J Intern Med. 2012;23(7):e175-6.]

III. Potencionální souvislost mezi *FTO* polymorfismem, u kterého jsme našli souvislost s rizikem AKS, a délkou telomer jsme sledovali u skupiny žen středního věku („3PMFs“). Zjistili jsme, že nositelky alespoň jedné alely G mají významně kratší relativní délku telomer v porovnání s TT homozygoty ($0,85 \pm 0,39$ vs. $0,93 \pm 0,48$; $P = 0,016$) a to nezávisle na BMI, podkožním tuku, obvodu pasu a věku ($P = 0,009$). [Dlouha D, Pitha J, Lanska V, Hubacek JA. Association between *FTO* 1st intron tagging variant and telomere length in middle aged females. 3PMFs study. Clin Chim Acta. 2012 16;413(15-16):1222-5.]

IV. Na základě doposud známých informací o *FTO* genu, jsme se rozhodli analyzovat expresi tohoto genu v lidské jaterní tkáni. Restrikční analýzou bylo detekováno 13 homozygotních jedinců pro alelu T a 3 pro alelu G. Distribuce genotypů odpovídala Hardy-Weinbergově rovnováze a byla testována chí-kvadrát testem ($P = 0,23$). Z 13 TT nositelů byla RNA použitelná pouze u 10. U homozygotních jedinců s rizikovou alelou G byla hladina mRNA nižší než u homozygotů TT. Pomocí Mann-Whitney testu jsme zjistili, že rozdíl v expresi *FTO* mezi uvedenými genotypy je statisticky významný $P = 0,043$. Hladiny celkové metylace DNA ve skupině jedinců s GG genotypem byly rovněž nesignifikantně ($P = 0,128$) nižší než u homozygotů TT.

Analýzou 11 vzorků gDNA izolované z leukocytů dobrovolníků z řad zaměstnanců CEM, jsme u 9 jedinců detekovali pokles celkové metylace DNA průměrně o 1,81 % 5 - mC za 20 let. Rozdíl metylace byl dle Wilcoxonova testu statisticky významný $P = 0,014$. Zároveň jsme u všech 11 jedinců detekovali pokles relativní délky telomer, $P = 0,004$.

Enviromentální faktory mohou významně ovlivňovat celkový stav DNA. Sledovali jsme metylační status DNA ve skupině kuřáků a nekuřáků vybraných z kontrolní populace „MONICA“. U skupiny nekuřáků, s věkovým průměrem 43,7 let, jsme detekovali nižší metylaci u homozygotů GG. Množství 5 - mC% bylo u GG a TT homozygotů v této

skupině prakticky identické ($P = 0,942$). Podobně tomu bylo u kuřáků (věkový průměr 38,5 let, $P = 0,869$). Globální metylace DNA u jedinců s genotypem GG resp. TT byla ve skupině kuřáků nevýznamně vyšší než ve skupině nekuřáků, $P = 0,122$ resp. $P = 0,229$. Porovnáním obou skupin, bez ohledu na *FTO* genotyp, jsme našli významně vyšší hladinu globální metylace DNA u kuřáků, $P = 0,049$, po adjustaci k věku, byl rozdíl mezi oběma analyzovanými skupinami ještě významnější, $P = 0,016$.

V. V české studii „post-MONICA“ (1 191 mužů, z toho 32,1% kuřáků, 1 368 žen, z toho 22,5% kuřaček) nebyl nalezen vztah mezi kuřáckým statutem či počtem vykouřených cigaret pro *FTO* varianty v intronech 1, 2 a 3. [Hubacek JA, **Dlouha D**, Lanska V, Adamkova V. Lack of an association between three tagging SNPs within the *FTO* gene and smoking behavior. *Nicotine Tob Res.* 2012 Aug;14(8):998-1002.]

Varianty rs17817449 resp. rs9939609 jsme sledovali u třech nezávislých kontrolních skupin („post-MONICA“, „HAPIEE“, skupina Lužických Srbů) a také u pacientů s alkoholickou cirhózou jater. Souvislost mezi variantou na 1. intronu *FTO* a rizikem alkoholismu jsme v naší rozsáhlé studii nepotvrdili. [Hubacek JA, Adamkova V, **Dlouha D**, Jirsa M, Šperl J, Tönjes A, Kovacs P, Pikhart H, Peasey A, Bobak M. Fat mass and obesity-associated (*FTO*) gene and alcohol intake. *Addiction.* 2012 Jun;107(6):1185-6.]

Frekvence genotypů *FTO* rs1558902 u žen (3PMFs) byly podobné a počet krevních destiček (jako možný faktor přispívající k rozvoji KVO) nekoreloval s variantou rs1558902. [Hubacek JA, **Dlouha D**, Lanska V, Stavek P, Pagacova L, Kralova-Lesna I, Pitha J. *FTO* first intron rs1558902 variant and platelets count in white middle-aged women: prague pre- and post-menopausal females (3PMFs) study. *J Investig Med.* 2013 Feb;61(2):291-3.]

ZÁVĚR

V předkládané dizertační práci jsou shrnuty výsledky studií provedených v Laboratoři pro výzkum aterosklerózy, která je součástí Centra experimentální medicíny Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze. Cílem všech studií bylo objasnit, do jaké míry může genotyp *FTO* sloužit jako marker rizika daného onemocnění. Podařilo se nám prokázat že:

1. Varianta rs17817449 v 1. intronu koreluje s BMI, naproti tomu varianta rs17818902 na 3. intronu *FTO* nesouvisí s hodnotami BMI u české populace. Je možné, že SNP na 3. intronu představuje novou kausální variantu haplotypu existujícího u srbské populace nebo je vliv varianty rs17818902 na BMI výsledkem interakce s vlivy prostředí nebo s genetickými variantami mimo oblast genu *FTO* specifickými pro izolovanou srbskou populaci. Naše výsledky podporují důležitost detailních analýz interakcí gen-gen nebo gen-prostředí, které by mohly objasnit vliv této varianty na patogenezi obezity různých populací. Oba sledované polymorfizmy nesouvisí s poklesem BMI během krátkodobé intervenční studie u žen. Varianta na 1. intronu však ovlivnila pokles BMI u obézních dětí během intenzivní intervenční studie.

2. Zjistili jsme souvislost mezi *FTO* polymorfismem a zvýšeným rizikem akutního koronárního syndromu u mužů. Riziko onemocnění bylo nezávislé na věku a BMI a zůstalo zvýšené i po vyloučení diabetiků. Naše studie tak prokázala souvislost mezi *FTO* polymorfismem a rizikem AKS. Výsledky naší práce potvrdil nálezy Doney a kol. [2009], který nepodpořil hypotézu, že by souvislost s AKS/IM byla zprostředkována DM. *FTO* genotyp by tedy mohl být důležitým rizikovým faktorem rozvoje AKS u mužů.

Varianta rs17817449 souvisí významně jak s rizikem renálního selhání u pacientů s ESRD/CKD, tak s nástupem tohoto onemocnění. Hemodialyzovaní pacienti s rizikovou alelou onemocněli v průměru o 3 roky a transplantováni o 2,5 roku dříve. Výsledky naší studie ukazují, že mezi onemocnění, které mohou být ovlivněny genem *FTO* patří i chronické onemocnění ledvin.

U skupiny pacientů s CRC jsme souvislost s variantou v 1. intronu *FTO* genu neprokázali. Naše studie, která je zatím nejrozsáhlejší na skupině pacientů s kolorektálním onemocněním, nenalezla souvislost mezi variantou rs17817449 a rizikem CRC onemocnění. Tyto výsledky posléze podpořily studie [Tarabra a kol. 2012, Nock a kol. 2011, Li a kol. 2012].

3. Nalezli jsme souvislost mezi *FTO* variantou na 1. intronu a relativní délkou telomer u žen v menopauze. Přesný mechanismus působení *FTO* není doposud znám. Předpokládá se, že patří mezi regulační proteiny, protože vykazuje nízkou DNA demetylažovou aktivitu a

pravděpodobně působí jako transkripční kofaktor. Nicméně právě buněčné/ biologické stárnutí organismu by mohlo být jedním z mechanismů jak varianty *FTO* ovlivňují výskyt a průběh zdánlivě nesouvisajících onemocnění.

4. V našem pilotním experimentu jsme detekovali, že hladina mRNA *FTO* v jaterní tkáni je rozdílná mezi homozygoty GG a TT. Nepotvrdili jsme souvislost mezi hladinou globální metylace DNA a rozdílným *FTO* genotypem. Hladina 5 – mC% nesouvisela ani s věkem testovaných jedinců. Nalezli jsme však signifikantní korelaci mezi hladinou celkové metylace DNA a statusem kuřáctví.

5. Nepotvrdili jsme souvislost mezi variantami v 1., 2. ani 3. intronu *FTO* a rizikem vzniku závislosti na tabáku či alkoholu u české populace ani mezi variantou rs1558902 a počtem krevních destiček u žen.

Prohlášení prvního autora:

Prohlašuji, že Mgr. Dana Dlouhá se jako spoluautorka prací významně podílela na designu studií, vlastních genetických analýzách, interpretaci výsledků a na spolupráci při tvorbě textu publikací.

Ing Jaroslav Hubáček CSc., DSc.

INTRODUCTION

The whole-genome screening (GWAs – „genome wide association study“) enables to detect new, so far unknown associations with phenotype of DNA variants. GWAs studies detected potential influence of multiple new genes on resulting BMI. Examples may include *INSIG2* gene (insulin-induced gene 2), *MC4R* (melanocortin-4 receptor gene) or so far the strongest genetic determinant of BMI levels, the *FTO* gene („fat mass and obesity associated“ gene) [Hainer et al. 2008, Marinou et al. 2010, Bogardus et al. 2009].

FTO variants in the first intron (and in some populations in the third intron as well) of this gene are associated with BMI levels and the presence of one high risk allele is associated with increase of body weight by 1.5 - 2 kg [Loos et al. 2008, Dina et al. 2007, Frayling et al. 2007]. The studies attempting to proof causality (effect of individual variants on energy consumption, basal metabolism, and physical activity) did not bring consistent results.

***FTO* gene**

Experimental studies

FTO (previously known as Fatso) was first described [Peters et al. 1999] in mice as one of six genes within extensive chromosome 8 deletion causing *Ft* (fused toes) phenotype [Boissel et al. 2009].

Rodent studies have detected the highest levels of *Fto* mRNA in the brain and hypothalamus during fasting or overeating. The *Fto* expression was regulated and yielded tissue specific variability [Peters et al. 1999, Loos et al. 2008, Dina et al. 2007, Frayling et al. 2007].

Characteristics of human *FTO* gene

FTO contains 9 exons in the total length more than 400 kb and is located in human chromosome 16 in position 16q12.2. The coded protein comprises 505 aminoacids (NCBI Reference Sequence: NP_001073901.1, OMIM ID 610966). The majority of functionally interesting polymorphisms (cluster of about 40 SNP) is located on the first intron in the region of strongly conservative interspecies sequence [Loos et al. 2008]. *FTO* is expressed in all human embryonic and adult tissues, the highest level of expression was detected in the

brain, hypothalamus and the liver [Boissel et al. 2009]. The *in vivo* FTO function is not known in detail, however, FTO shares sequence motives with Fe²⁺ and 2 - oxoglutarate - dependent oxygenases [Fawcett et al. 2010]. Recombinant FTO is a catalyst in demethylation of 3-methylthymine ssDNA and lower degree of 3-methyluridine in ssRNA *in vitro* [Gerken et al. 2007]. FTO may also act as transcription coactivator [Wu et al. 2010].

FTO gene polymorphisms and their role in determining BMI

Three papers were published in 2007 [Dina et al. 2007, Frayling et al. 2007, Scuteri et al. 2007], reporting the association of FTO genes variants and BMI. Three variants were primarily studied including rs9939609 (T/A), rs1421085 (C/T), and rs17817449 (G/T). Allele A (rs9939609), C (rs1421085), and G (rs17817449) were strongly associated with obese phenotype. As it was shown later [Hubacek et al. 2009], these variants are in a strong bond dysbalance. In the Caucasian population, at least one high risk allele is present in about 60% of the population, about 20% people have two of those allelee [Loos et al. 2008, Dina et al. 2007, Frayling et al. 2007, Scuteri et al. 2007]. There are also significant interethnic differences both in allelee frequency as well as in the degree of found bond dysbalance. [Bollepalli et al. 2010, Lopez – Bermejo et al. 2008, Liu G et al. 2010, Rendo et al. 2009, Demerath et al. 2011, Liu Y et al. 2010, Cheung et al. 2010, Adeyemo et al. 2010]. GWA analysis of isolated population of Lusatian Serbs detected variants in intron 3 region as further predictors of BMI values independently from intron 1. Combination of C and G allelee in SNPs rs10521308 and rs17818902, associated with lower mean BMI is present in about 18 % of the population [Tónjes et al. 2010].

Mutations

Mutations deactivating *FTO* are prevalent both in obese and slim individuals therefore they are not directly associated with development of obesity as such. One of the mutations inactivating *FTO* was mentioned in association with autozomal recessive determination of mortality [Boisel et al. 2009, Meyre et al. 2010].

Association study and selected health conditions

The *FTO* gene was primarily detected in GWAs studies focused on the analysis of genetic disposition to type 2 diabetes mellitus (DM2) [Frayling et al. 2007, Legry et al.

2009, Scott et al. 2007, Burton et al. 2007]. The association between *FTO* and DM2 is partially but not completely attributed to higher BMI levels. Doney et al. [2009] have also found that higher adipous tissue mass in carriers of allele A (rs9939606) is associated with increased atherogenic lipid profile and the risk of myocardial infarction (MI). Lappalainen et al. [2011] found that *FTO* polymorphism rs9969609 may contribute to the development of CVD in males with impaired glucose metabolism. The studies monitoring CVD prevalence in healthy white women found increased risk of CVD in women with A allele and those who engage in less physical activity [Ahmad et al. 2010]. There has been several papers published studying the association between *FTO* polymorphism (rs9939609) and the occurrence of cancer [Brennan et al. 2009, Gaudet et al. 2010, Lurie et al. 2011, Lewis et al. 2010, Nock et al. 2011]. Other papers have studied the association between *FTO* gene variants and polycystic ovarian syndrome [Asunción et al. 2000, Legro et al. 2000, Barber et al. 2008, Attaoua et al. 2008], the level of *FTO* expression in the placenta, birth weight and length of infants [Bassols et al. 2010], mortality [Zimmermann et al. 2009, Sonestedt et al. 2011], developing tobacco and alcohol dependency [Bierut et al. 2007, Sobczyk – Kopciol et al. 2011], reduction of frontal brain lobe volume and the development of Alzheimer disease [Ho et al. 2010, Benedict et al. 2011, Keller et al. 2011].

OBJECTIVES

I. The first objective of the thesis was to find whether *FTO* variants in the 1st and 3rd *FTO* gene intron are associated with BMI levels in the Czech population cohort from „MONICA“ study and whether they correlate with BMI changes during interventional studies in women and children.

II. The second objective of the thesis was to determine if there is association between *FTO* variant rs17817449 and the risk of development of some civilization diseases of the Czech population.

III. The third part of this thesis was focused on the study of association between *FTO* polymorphism rs17817449 and relative telomere length measured in peripheral blood leucocytes.

IV. The fourth objective of the thesis was to find out whether various genotype of variant rs17817449 of the *FTO* gene is associated with mRNA *FTO* level in the liver tissue and to analyze the general rate of DNA methylation in selected group of individuals with various *FTO* genotypes.

V. The last part of the thesis is aimed at confirmatory studies of selected *FTO* polymorphism (rs17817449, rs2302673, rs17818902) with the risk of tobacco or alcohol dependency in the Czech population. The association between rs1558902 variant and peripheral blood platelet count was analyzed from the women enrolled in the 3PMFs study.

MATERIAL AND METHODS

Analyzed cohorts

MONICA – population study *Multinational monitoring of trends and determinants in cardiovascular diseases*, 2559 unrelated individuals from Caucasian population (1 191 men, 1 368 women, age 25 – 65 years). During 1997-1998, the individuals from 9 districts of the Czech Republic were examined according to the WHO protocol and the same examination was repeated in 2000 - 2001 [Cifková et al. 2010, Tunstall-Pedoe et al. 2003].

Czech HAPIEE – population study *Health, alcohol and psychosocial factors in Eastern Europe*, included 6 827 selected individuals from population registry from 7 Czech cities (45% men, 45 – 69 years), with samples collected from 2002 – 2005 [Peasey et al. 2006].

107 women without history of diabetes mellitus (BMI > 27.5 kg/ m², age 49.2 ± 12.3 years).

357 obese unrelated children (age 13.7 ± 4.9 years, BMI 30.8 ± 4.6 kg/ m²).

1 092 males with acute coronary syndrome whose samples have been collected from 2006 to 2009 within the **GENDEMIP** study (*GENetic DEtermination of Myocardial Infarction in Prague*) from five collaborating coronary care units located in Prague [Pitha et al. 2007].

1 014 hemodialyzed patients (56% males, age 66.9 ± 12.7, hypertension 63%, diabetes mellitus 39%, BMI 26.2 ± 5.0 kg/ m²) from total 27 centers in the Czech Republic.

1 251 patients (95% males, age 47.2 ± 13.0) who have had renal transplant because of CKD or ESRF in the Institute for Clinical and Experimental Medicine from 1999 to 2007

(prevalence of participants treated with hypertension was 82%, 35% had diabetes and mean BMI level was = 25.5 kg/ m²).

1 005 adult patients with colorectal cancer - 583 males, 422 females, age 61.2 ± 11.0 years [Jiraskova et al. 2012].

908 females participating in the **3PMFs** (*The Prague Pre and Post Menopausal Females study*) – which is a representative and randomly selected sample (5%) from 29 440 females living in Prague aged 45 – 54 years who were selected from the medical insurers registry. In the cohort of 1 472 females, 908 consented with further investigation in this study. [Cifkova et al. 2008, Pitha et al. 2007 a 2013].

201 patients with alcoholic liver cirrhosis.

25 samples **after liver resection**.

11 volunteers from the Centre for Experimental Medicine employees.

Methods

DNA isolation

Genomic DNA was isolated from full blood using the method of Miller et al. [1988] with minor modification.

***FTO* genotyping**

FTO polymorphisms were detected by PCR and subsequent restriction analysis [Hubacek et al. 2008 and 2009].

***FTO* expression in the liver tissue**

RNA was isolated using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany) and purified using RNase-Free DNase Set (Qiagen, Germany). RNA aliquots were transcribed by reverse transcription to cDNA (Thermo Scientific Verso™ cDNA Synthesis Kit). Using qPCR and 2^{-ΔΔCt} methods that found levels of *FTO* mRNA. As endogenous control we have used housekeeping gene *GAPDH*. The mRNAs levels were quantified using primers and dual marker probes developed by Sigma Aldrich.

Telomere length analysis

Relative length of telomeres was detected by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) according Cawton et al. [2002]. The rTL level is determined as the ratio of telomere sequence repetitions to the number of copies of single – copy gene (SCG - ribosomal phosphoprotein PO (36B4) T/S ratio. The number of telomeric repetitions and SCG copies of individual samples were determined by comparative quantification analysis (Rotor-Gene 3000 software, Corbett Research Ltd) [Cawton 2002, Salpea et al. 2008]. Reproducibility of rTL measurements were validated by intra- and inter- assay testing. The mean values of variation coefficient of intra assay ranged from 1.9 – 6.9% and inter assay variation coefficient was 3.4 – 14.8%.

Determine total DNA metylation

The methylation analysis was done by MethylFlash™ Methylated DNA Quantification Kit Colorimetric (Epigentek Group Inc., Farmingdale, NY, USA.). The quantity of methylated DNA (5 - mC) is proportional to the measured sample optic density (OD). The quantity and percentage of 5 - mC in total DNA was determined by absolute quantification.

COMMENTS ON THE RESULTS AND DISCUSSION

The detailed results of the research *in extenso* are contained in the above named papers and manuscripts.

I. We attempted to replicate findings by Tönjes et al. who using GWA in isolated population of Lusatian Serbs found independent *FTO* signal in the region of introns 2/3. The strongest effect on BMI was found in variant rs17818902. We have analyzed a group of individuals from the „MONICA“ project. Above this we have also analyzed samples from 556 university students from České Budějovice and the surrounding region. Although the frequency of individual genotypes were in Hardy-Weinberg balance ($P = 0.49$) and were not different between the Czech and Serbian population, we did not confirm the association between rs17818902 and BMI values. [**Dlouha D, Adamkova V, Lanska V, Hubacek JA.** Lack of association between a new tag SNP in the *FTO* gene and BMI in Czech-Slavonic population. *Eur J Hum Genet.* 2010;18(12):1274]

We have also studied *FTO* polymorphisms rs17817449 (1st intron) and rs17818902 (3rd intron) during short term interventional study in women without history of diabetes mellitus. The average weight loss was 4.8 ± 3.5 kg ($5.3 \pm 3.5\%$, maximum – 15.5 kg and minimum + 2.0 kg, $P < 0.01$). The association between studied variants and BMI reduction was not found. [Dlouhá D, Suchánek P, Lánská V, Hubáček JA. Body mass index change in females after short-time life style intervention is not dependent on the *FTO* polymorphisms. *Physiol Res.* 2011; 60(1):199-202.]

The association of *FTO* gene polymorphisms (rs17817449) and *MC4R* (rs17782313) with the reduction of body weight was studied in obese unrelated children during a 4-week interventional study. The study participants had optimal age adjusted reduced energy intake and daily exercise program. The mean weight loss was 6.2 ± 2.1 kg ($P < 0.001$). We have found statistically significant association between BMI reduction in the children and studied polymorphisms of both genes. Carriers of the *FTO* GG variant and/or *MC4R* CC variant achieved more pronounced weight reduction than others ($P < 0.0009$ for BMI, $P < 0.002$ for body weight). These differences remain significant even after adjusting for gender, age and baseline characteristics ($P = 0.004$ for BMI and $P = 0.01$ for body weight). Our study suggested that *FTO* and *MC4R* genes variants influence the resulting BMI reduction in obese children during intensive interventional study. [Zlatohlavek L, Vrablik M, Motykova E, Ceska R, Vasickova L, Dlouha D, Hubacek JA. *FTO* and *MC4R* gene variants determine BMI changes in children after intensive lifestyle intervention. *Clin Biochem.* 2013;46(4-5):313-6.]

II. We have analyzed rs17817449 variant in males with **acute coronary syndrome (ACS)** who participate in „GENDEMIP“ study. The control sample was taken from males participating in the „MONICA“ project. The group of patients with ACS was in general older, with higher proportion of smokers, diabetics and hypertensive individuals than the control group. BMI values of the patients did not differ from the controls. The total cholesterol levels were surprisingly lower in the patients with ACS even after excluding patients on lipid-lowering medication. Genotype frequency in Czech population

corresponded to the frequency in other European populations. The analyzed variant was significantly associated with BMI both in the patients ($P < 0.01$), as well as controls ($P < 0.02$). The highest BMI was found in homozygots for G allele and the lowest BMI for TT homozygots, in both studied groups. The frequency of GG genotype in patients with ACS was significantly different from prevalence in the control group (21.4% vs. 15.9%, $P < 0.005$). Carriers of *FTO* GG variant had significantly higher risk of ACS compared to the TT individuals. The risk was independent from age and BMI (OR 1.49, 9 % confidence interval 1.16 – 1.93). The increased risk of ACS for GG genotype remained even after excluding diabetic individuals (100 controls, 339 patients with ACS) OR 1.32 (95% CI 1.01 – 1.72). [Hubacek JA, Stanek V, Gebauerová M, Pilipincová A, **Dlouhá D**, Poledne R, Aschermann M, Skalická H, Matousková J, Kruger A, Penicka M, Hrabáková H, Veselka J, Hájek P, Lánská V, Adámková V, Pitha J. A *FTO* variant and risk of acute coronary syndrome. Clin Chim Acta. 2010; 411(15-16):1069-72.]

We have performed two independent studies in patients with **chronic kidney disease (CKD)**/ and end-stage renal failure (**ESRD**) in the Czech Republic, in whom we have studied the rs17817449 variant. In the first case, we have analyzed patients on hemodialysis. The control group was taken from the cohort of individuals from “post – MONICA”, who were without CKD or ESRD. In the second study, we have analyzed patients after renal transplant with previous history of CKD or renal failure. The control group was found in the volunteers from Czech study „HAPIEE“. *FTO* genotype was associated both control groups with BMI. The frequency of *FTO* genotypes was significantly different between patients and control groups in both studies. The risk (odds ratio) of developing CKD or renal failure was increased in the presence of G allele. In the first case the OR of renal failure or CKD in GG genotype compared to TT homozygote was 1.56 (95% CI 1.27 – 1.96) and the trend of increasing OR with increased number of G allele was highly significant ($P = 0.00004$). The results of the second study were similar with OR of renal failure or CKD for GG genotype vs. TT genotype being 1.27 (95% CI 1.07 – 1.51, $P = 0.006$). Frequency of the *FTO* genotypes in both groups of patients and controls did not significantly differ ($P = 0.60$, respectively $P = 0.07$). After combining both studies,

the OR for CKD/ renal failure for GG genotype vs. TT genotype was 1.37 (1.20 – 1.56, P = 0.000011). After adjusting to age and gender these values were nearly identical: OR 1.34 (1.16 – 1.54) respectively OR 1.13 (1.00 – 1.47). Apart from what we have found in both hemodialyzed patients with GG genotype as well as in the transplanted patients, the disease develops approximately 3 years earlier than in patients with TT genotype. [Hubacek JA, Viklicky O, **Dlouha D**, Bloudickova S, Kubinova R, Peasey A, Pikhart H, Adamkova V, Brabcova I, Pokorna E, Bobak M. The *FTO* gene polymorphism is associated with end-stage renal disease: two large independent case-control studies in a general population. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(3):1030-5.]

We studied whether *FTO* gene variant rs17817449 correlates with the occurrence of **colorectal cancer** (CRC) in Czech population. It is well known that the Czech Republic has highest incidence rate of CRC worldwide. We have analyzed the extensive group of adult patients. The control group included individuals participating in the „HAPIEE“ study. Genotype frequency in patients with CRC and healthy controls were not significantly different for dominance (P = 0.31), co-dominant (P = 0.78) or recessive (P = 0.85) model. [Hubacek JA, **Dlouha D**, Bobak M, Jiraskova A, Vitek L. The risk of sporadic colorectal cancer development is not influenced by fat mass and obesity related gene polymorphism in Slavs. *Eur J Intern Med*. 2012; 23(7):e175-6.]

III. Potential association between *FTO* polymorphism that was associated with the risk of ACS and telomere length was studied in a group of middle aged women („3PMFs“). We have found that carriers of at least one G allele have significantly shorter relative telomere duration compared to TT homozygots (0.85 ± 0.39 vs. 0.93 ± 0.48 ; P = 0.016) and which is independent from BMI, subcutaneous fat, waist circumference and age (P = 0.009). [**Dlouha D**, Pitha J, Lanska V, Hubacek JA. Association between *FTO* 1st intron tagging variant and telomere length in middle aged females. 3PMFs study. *Clin Chim Acta*. 2012 16;413(15-16):1222-5.]

IV. Based on the information known about the ***FTO* gene** we attempted to analyze **expression** of this gene in human liver tissue. Restriction analysis detected 13 homozygote individuals for T allele and 3 individuals for G allele. Distribution of genotype corresponded

to the Hardy-Weinberg balance and was tested by chi-square test ($P = 0.23$). In 13 TT carriers the RNA could be used only in 10 cases. In homozygote individuals with high risk G allele, the mRNA level was lower than in TT homozygotes. Using Mann-Whitney test we found that the difference in FTO expression between these genotypes is statistically significant with $P = 0.043$. The levels of total **DNA methylation** in GG genotype individuals were also not significantly ($P = 0.128$) lower than in TT homozygotes.

By analyzing 11 samples of gDNA isolated from leukocytes of volunteers of CEM employees we have detected in 9 individuals the reduction of total **DNA methylation** in average by 1.81% of 5 - mC per 20 years. The difference in methylation was significant by Wilcoxon test $P = 0.014$. At the same time we have detected reduction of relative telomere length in all 11 individuals with $P = 0.004$.

Environmental factors can significantly influence the total condition of DNA. We have studied DNA methylation status in the group of smokers and non-smokers selected from the control population of „MONICA“ study. In non-smokers with mean age 43.7 years, we detected lower methylation in GG homozygotes. The quantity of 5 - mC% was in GG and TT homozygotes in this group nearly identical ($P = 0.942$). The same was in the subgroup of smokers (mean age 38.5 years, $P = 0.869$). The global DNA methylation in GG homozygotes and TT homozygotes was in the group of smokers non-significantly higher than in non-smokers, $P = 0.122$ respectively $P = 0.229$. By comparing both groups irrespective of FTO genotype we found significantly higher level of global methylation of DNA in the smokers, $P = 0.049$, after adjusting to the age the difference between the analyzed groups was even more significant, $P = 0.016$.

V. In the Czech study „post-MONICA“ (1 191 males, including 32.1% smokers, 1 368 females, including 22.5% smokers) we did not find any relationship between smoking status or number of smoked cigarettes for FTO variants in introns 1, 2, and 3. [Hubacek JA, Dlouha D, Lanska V, Adamkova V. Lack of an association between three tagging SNPs within the FTO gene and smoking behavior. Nicotine Tob Res. 2012 Aug;14(8):998-1002.]

The rs17817449 and rs9939609 variants were studied in three independent control groups („post-MONICA“, „HAPIEE“, group of Lusatian Serbs) and also in patients with

alcoholic liver cirrhosis. The association between variant of *FTO* 1st intron and the risk of alcoholism was not confirmed in our extensive study. [Hubacek JA, Adamkova V, **Dlouha D**, Jirsa M, Šperl J, Tönjes A, Kovacs P, Pikhart H, Peasey A, Bobak M. Fat mass and obesity-associated (*FTO*) gene and alcohol intake. *Addiction*. 2012 Jun; 107(6):1185-6.]

The *FTO* genotype rs1558902 in females (3PMFs) was similar and the peripheral blood platelets count (as potential factor contributing to the development of CVD) did not correlate with the rs1558902 variant. [Hubacek JA, **Dlouha D**, Lanska V, Stavek P, Pagacova L, Kralova-Lesna I, Pitha J. *FTO* first intron rs1558902 variant and platelets count in white middle-aged women: prague pre- and post-menopausal females (3PMFs) study. *J Investig Med*. 2013 Feb; 61(2):291-3.]

CONCLUSION

The presented thesis includes results of studies performed in the Laboratory for Atherosclerosis Research, which is part of the Centre of Experimental Medicine in the Institute for Clinical and Experimental Medicine in Prague. The objective of these studies was to determine how much could *FTO* genotype be used as a marker of the risk of a given condition. We succeeded to find that:

1. The rs17817449 variant in the 1st intron correlates with BMI while rs17818902 variant in the 3rd intron of *FTO* is not associated with BMI levels in the Czech population. It is possible that SNP on the 3rd intron is a new causal variant of haplotype existing in the Serb population, or the effect of rs17818902 variant to BMI is a result of interaction with the environmental factors or with genetic variants outside the *FTO* gene specific for isolated Serb population. Our results confirm the significance of detailed analysis of interactions gene-gene or gene-environment which could clarify the influence of this variant on the pathogenesis of obesity in different populations.

Both studies of polymorphisms are not associated with the reduction of BMI during short-term intervention study in females. The variant of the 1st intron, however, influenced the BMI reduction in obese children during intensive interventional study.

2. We have found association between *FTO* polymorphism and increased risk of acute coronary syndrome in males. The risk of illness was independent from age and BMI and

remained increased even after excluding diabetic patients. This study found association between *FTO* polymorphism and the risk of ACS. The results of our work were confirmed by Doney et al. [2009] who did not support the hypothesis that ACS/MI would be mediated by diabetes. *FTO* genotype could be important risk factor of ACS in males.

The rs17817449 variant is significantly associated both with the risk of renal failure in patients with ESRD/ CKD and also the date of onset of this condition. Hemodialyzed patients with the risk allele developed this condition in a mean of 3 years earlier whereas transplanted patients about 2.5 years earlier. The results of this study suggest that this condition could be influenced by *FTO* gene in chronic kidney disease.

In the CRC patients, we have not found association between the CRC and the variant in the 1st intron of *FTO* gene. Our study which is so far the most extensive study in the group of patients with colorectal cancer did not find association between rs17817449 variant and the risk of CRC. These results were also confirmed by further studies [Tarabra et al. 2012, Nock et al. 2011, Li et al. 2012].

3. We have found association between the *FTO* variant on the 1st intron and relative telomere length in menopausal women. The precise mechanism of action of *FTO* is not known yet. It could be hypothesized that it acts as a regulation protein as it has low DNA demethylase activity and probably acts as a transcription co-factor. Nevertheless it is cellular/biological aging that could be one of the mechanisms by which *FTO* variants influence the development and natural history of otherwise not associated conditions.

4. In our pilot experiment we have detected that *FTO* mRNA level in the liver tissue is different between homozygotes GG and TT. We did not find association between global DNA methylation level and different *FTO* genotypes. The level 5 – mC% was not associated with the age of tested individuals. We have found, however, significant correlation between the level of total DNA methylation and smoking status.

5. We did not find association between variants in the 1st, 2nd and 3rd *FTO* intron and the risk of developing tobacco or alcohol dependency in the Czech population nor any association between rs1558902 variant and platelet count in women.

Statement of the first author:

I confirm that Mgr. Dana Dlouhá has significantly participated as a co-author in the design of the studies, the genetic analysis, interpretation of the results and participating in writing the manuscript.

Ing Jaroslav Hubáček CSc., DSc.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY/ *References*

- Adeyemo A, Chen G, Zhou J, et al. *FTO* genetic variation and association with obesity in West Africans and African Americans. *Diabetes* 2010; 59: 1549-1554.
- Ahmad T, Chasman DI, Mora S, et al. The fat-mass and obesity-associated (*FTO*) gene, physical activity, and risk of incident cardiovascular events in white women. *Am Heart J* 2010; 160: 1163-1169.
- Asunción M, Calvo RM, San Millán JL, et al. A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2434-2438.
- Attaoua R, Ait El, MkaDEM S, et al. *FTO* gene associates to metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 373: 230-234.
- Barber TM, Bennett AJ, Groves CJ, et al. Association of variants in the fat mass and obesity associated (*FTO*) gene with polycystic ovary syndrome. *Diabetologia* 2008; 51: 1153-1158.
- Bassols J, Prats-Puig A, Vázquez-Ruiz M, et al. Placental *FTO* expression relates to fetal growth. *Int J Obes (Lond)* 2010; 34: 1365-1370.
- Benedict C, Jacobsson JA, RönneMaa E, et al. The fat mass and obesity gene is linked to reduced verbal fluency in overweight and obese elderly men. *Neurobiol Aging* 2011; 32 (6): 1159.
- Bierut LJ, Madden PA, Breslau N, et al. Novel genes identified in a high-density genome wide association study for nicotine dependence. *Hum Mol Genet* 2007; 16(1):24-35.
- Bogardus C. Missing heritability and GWAS utility. *Obesity (Silver Spring)* 2009; 17:209-210.
- Boissel S, Reish O, Proulx K, et al. Loss-of-function mutation in the dioxygenase-encoding *FTO* gene causes severe growth retardation and multiple malformations. *Am J Hum Genet* 2009; 85: 106-111.
- Bollepalli S, Dolan LM, Deka R, et al. Association of *FTO* gene variants with adiposity in African-American adolescents. *Obesity (Silver Spring)* 2010; 18: 1959-1963.

- Brennan P, McKay J, Moore L, et al. Obesity and cancer: Mendelian randomization approach utilizing the *FTO* genotype. *Int J Epidemiol* 2009; 38: 971-975.
- Burton PR, Clayton DG, Cardon LR et al. The Wellcome Trust Case-Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007; 447: 661-678.
- Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 30, e47.
- Cifkova R, Pitha J, Lejskova M, et al. Blood pressure around the menopause: a population study. *J Hypertens* 2008; 26(10):1976-82.
- Cífková R, Skodová Z, Bruthans J, et al. Longitudinal trends in major cardiovascular risk factors in the Czech population between 1985 and 2007/8. Czech MONICA and Czech post-MONICA. *Atherosclerosis* 2010; 211(2):676-81.
- Demerath EW, Lutsey PL, Monda KL, et al. Interaction of *FTO* and physical activity level on adiposity in African-American and European-American adults: the ARIC Study. *Obesity (Silver Spring)* 2011; 19: 1866-1872.
- Dina C, Meyre D, Gallina S, et al. Variation in *FTO* contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet* 2007; 39: 724-726.
- Doney AS, Dannfald J, Kimber CH, et al. The *FTO* gene is associated with an atherogenic lipid profile and myocardial infarction in patients with type 2 diabetes: a Genetics of Diabetes Audit and Research Study in Tayside Scotland (Go-DARTS) study. *Circ Cardiovasc Genet* 2009; 2: 255-259.
- Fawcett KA, Barroso I. The genetics of obesity: *FTO* leads the way. *Trends Genet* 2010; 26: 266-274.
- Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, et al. A common variant in the *FTO* gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 2007; 316: 889-894.
- Gaudet MM, Yang HP, Bosquet JG, et al. No association between *FTO* or *HHEX* and endometrial cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19: 2106-2109.

- Gerken T, Girard CA, Tung YC, et al. The obesity-associated *FTO* gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science* 2007; 318: 1469-1472.
- Hainer V, Zamrazilová H, Spálová J, et al. Role of hereditary factors in weight loss and its maintenance. *Physiol Res* 2008; 57 (Suppl 1): S1-S15.
- Ho AJ, Stein JL, Hua X, et al. A commonly carried allele of the obesity-related *FTO* gene is associated with reduced brain volume in the healthy elderly. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2010; 107 (18): 8404-9.
- Hubacek JA, Bohuslavova R, Kuthanova L, et al. The *FTO* gene and obesity in a large Eastern European population sample: the HAPIEE study. *Obesity (Silver Spring)*. 2008; 16(12):2764-6.
- Hubacek JA, Pikhart H, Peasey A, et al. *FTO* variant, energy intake, physical activity and basal metabolic rate in Caucasians. The HAPIEE study. *Physiol Res* 2011; 60: 175-183.
- Hubacek JA, Pitha J, Adamkova V, et al. A common variant in the *FTO* gene is associated with body mass index in males and postmenopausal females but not in premenopausal females. Czech post-MONICA and 3PMFs studies. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47: 387-390.
- Cheung CY, Tso AW, Cheung BM, et al. Obesity susceptibility genetic variants identified from recent genome-wide association studies: implications in a chinese population. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 1395-1403.
- Jirásková A, Novotný J, Novotný L, et al. Association of serum bilirubin and promoter variations in *HMOX1* and *UGT1A1* genes with sporadic colorectal cancer. *Int J Cancer* 2012; 131(7):1549-55.
- Keller L, Xu W, Wang HX, et al. The obesity related gene, *FTO*, interacts with *APOE*, and is associated with Alzheimer's disease risk: a prospective cohort study. *J Alzheimers Dis* 2011; 23 (3): 461-9.
- Lappalainen T, Kolehmainen M, Schwab US, et al. Association of the *FTO* gene variant (rs9939609) with cardiovascular disease in men with abnormal glucose metabolism - The Finnish Diabetes Prevention Study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011; 21: 691-698.

- Legro RS. The genetics of obesity. Lessons for polycystic ovary syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 900: 193-202.
- Legry V, Cottel D, Ferrières J, et al. Effect of an *FTO* polymorphism on fat mass, obesity, and type 2 diabetes mellitus in the French MONICA Study. *Metabolism* 2009; 58: 971-975.
- Lewis SJ, Murad A, Chen L, et al. Associations between an obesity related genetic variant (*FTO* rs9939609) and prostate cancer risk. *PLoS One* 2010; 5 : e13485.
- Liu G, Zhu H, Lagou V, et al. *FTO* variant rs9939609 is associated with body mass index and waist circumference, but not with energy intake or physical activity in European- and African- American youth. *BMC Med Genet* 2010; 11: 57.
- Liu Y, Liu Z, Song Y, et al Meta-analysis added power to identify variants in *FTO* associated with type 2 diabetes and obesity in the Asian population. *Obesity (Silver Spring)* 2010; 18: 1619-1624.
- Loos RJ, Bouchard C. *FTO*: the first gene contributing to common forms of human obesity. *Obes Rev* 2008; 9: 246-250.
- Lopez-Bermejo A, Petry CJ, Diaz M, et al. The association between the *FTO* gene and fat mass in humans develops by the postnatal age of two weeks. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 1501-1505.
- Lurie G, Gaudet MM, Spurdle AB, et al. The obesity-associated polymorphisms *FTO* rs9939609 and *MC4R* rs17782313 and endometrial cancer risk in non-Hispanic white women. *PLoS One* 2011; 6: e16756.
- Marinou K, Tousoulis D, Antonopoulos AS, et al. Obesity and cardiovascular disease: from pathophysiology to risk stratification. *Int J Cardiol.* 2010; 138: 3-8.
- Meyre D, Proulx K, Kawagoe-Takaki H et al. Prevalence of loss-of-function *FTO* mutations in lean and obese individuals. *Diabetes* 2010; 59: 311-318.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for DNA extraction from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 1988; 16:1215.

- Nock NL, Plummer SJ, Thompson CL, et al. *FTO* polymorphisms are associated with adult body mass index (BMI) and colorectal adenomas in African-Americans. *Carcinogenesis* 2011; 32(5):748-56.
- Peasey A, Bobak M, Kubinova R, et al. Determinants of cardiovascular disease and other non-communicable diseases in Central and Eastern Europe: rationale and design of the HAPIEE study. *BMC Public Health* 2006; 18; 6:255.
- Peters T, Ausmeier K, Rütger U. Cloning of Fatso (*FTO*), a novel gene deleted by the Fused toes (Ft) mouse mutation. *Mamm Genome* 1999;10: 983-986.
- Pitha J, Hubacek JA, Poledne R, et al. Genetic determination of the prognosis in survivors of the acute coronary syndromes. Study design and rationale for a multicenter study. *Cor Vasa* 2007; 49: 134-137.
- Pitha J, Králová-Lesná I, Sekerková A, et al. Menopausal transition enhances the atherogenic risk of smoking in middle aged women. *Int J Cardiol* 2013;168(1):190-6.
- Rendo T, Molerés A, Martí Del Moral A. Effects of the *FTO* gene on lifestyle intervention studies in children. *Obes Facts* 2009; 2: 393-399.
- Salpea KD, Nicaud V, Tiret L, et al.: EARS II group. The association of telomere length with paternal history of premature myocardial infarction in the European Atherosclerosis Research Study II. *J Mo. Med (Berl)* 2008; 86, 815-824.
- Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, et al. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 2007; 316: 1341-1345.
- Scuteri A, Sanna S, Chen WM, et al. Genome-wide association scan shows genetic variants in the *FTO* gene are associated with obesity related traits. *PLoS Genet* 2007; 3: e115.
- Sobczyk-Kopciol A, Broda G, Wojnar M, et al. Inverse association of the obesity predisposing *FTO* rs9939609 genotype with alcohol consumption and risk for alcohol dependence. *Addiction* 2011; 106: 739-748.
- Sonestedt E, Gullberg B, Ericson U, et al. Association between fat intake, physical activity and mortality depending on genetic variation in *FTO*. *Int J Obes (Lond)* 2011; 35: 1041-1049.

- Tönjes A, Zeggini E, Kovacs P, et al. Association of *FTO* variants with BMI and fat mass in the self-contained population of Sorbs in Germany. *Eur J Hum Genet* 2010; 18: 104-110.
- Tunstall-Pedoe H. MONICA Monograph and Multimedia Sourcebook. Geneva: World Health Organisation, 2003.
- Wu Q, Saunders RA, Szkudlarek-Mikho M, et al. The obesity-associated *FTO* gene is a transcriptional coactivator. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 401: 390-395.
- Zimmermann E, Kring SI, Berentzen TL, et al. Fatness-associated *FTO* gene variant increases mortality independent of fatness - in cohorts of Danish men. *PLoS One* 2009; 4: e4428.

SEZNAM PUBLIKACÍ/ LIST OF PUBLICATIONS

HUBACEK JA, **DLOUHA D**, LANSKA V, STAVEK P, PAGACOVA L, KRALOVA-LESNA I, PITHA J. FTO first intron rs1558902 variant and platelets count in white middle-aged women: prague pre- and post-menopausal females (3PMFs) study. *J Investig Med*. 2013;61(2):291-3. IF = 1.75

ZLATOHLAVEK L, VRABLIK M, MOTYKOVA E, CESKA R, VASICKOVA L, **DLOUHA D**, HUBACEK JA. FTO and MC4R gene variants determine BMI changes in children after intensive lifestyle intervention. *Clin Biochem*. 2013;46(4-5):313-6. IF = 2.45

HUBACEK JA, **DLOUHA D**, ADÁMKOVA V, LANSKA V, CESKA R, VRABLIK M. Possible gene-gender interaction between the SLCO1B1 polymorphism and statin treatment efficacy. *Neuro Endocrinol Lett*. 2012;33 Suppl 2:22-5. IF = 1.29

DLOUHA D, PITHA J, ADÁMKOVA V, LANSKA V, HUBACEK JA. Variants within HNF1 α and ANGPTL4 genes and acute coronary syndrome in Czech population. The GENDEMIP study. *Neuro Endocrinol Lett*. 2012;33 Suppl 2:13-6. IF = 1.29

VRABLÍK M, HUBÁČEK JA, **DLOUHÁ D**, LÁNSKÁ V, RYNEKROVÁ J, ZLATOHLÁVEK L, PRUŠÍKOVÁ M, CEŠKA R, ADÁMKOVÁ V. Impact of variants within seven candidate genes on statin treatment efficacy. *Physiol Res*. 2012;61(6):609-17. IF = 1.53

HUBACEK JA, **DLOUHA D**, BOBAK M, JIRASKOVA A, VITEK L. The risk of sporadic colorectal cancer development is not influenced by fat mass and obesity related gene polymorphism in Slavs. *Eur J Intern Med*. 2012;23(7):e175-6. IF = 2.94

HUBACEK JA, ADAMKOVA V, **DLOUHA D**, JIRSA M, ŠPERL J, TÖNJES A, KOVACS P, PIKHART H, PEASEY A, BOBAK M. Fat mass and obesity-associated (FTO) gene and alcohol intake. *Addiction*. 2012 Jun;107(6):1185-6. IF = 4.75

DLOUHA D, PITHA J, LANSKA V, HUBACEK JA. Association between FTO 1st intron tagging variant and telomere length in middle aged females. 3PMFs study. *Clin Chim Acta*. 2012 16;413(15-16):1222-5. IF = 2.54

DLOUHÁ D, HUBÁČEK JA. FTO gene and his role in genetic determination of obesity. *Vnitr Lek*. 2012 Mar;58(3):208-15.

HUBACEK JA, **DLOUHA D**, LANSKA V, ADAMKOVA V. Lack of an association between three tagging SNPs within the FTO gene and smoking behavior. *Nicotine Tob Res*. 2012 Aug;14(8):998-1002. IF = 2.45

HUBACEK JA, VIKLICKY O, **DLOUHA D**, BLOUDICKOVA S, KUBINOVA R, PEASEY A, PIKHART H, ADAMKOVA V, BRABCOVA I, POKORNA E, BOBAK M. The FTO gene polymorphism is associated with end-stage renal disease: two large independent case-control studies in a general population. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27(3):1030-5. IF = 3.37

DLOUHÁ D, SUCHÁNEK P, LÁNSKÁ V, HUBÁČEK JA. Body mass index change in females after short-time life style intervention is not dependent on the FTO polymorphisms. *Physiol Res.* 2011;60(1):199-202. IF = 1.56

DLOUHA D, ADAMKOVA V, LANSKA V, HUBACEK JA. Lack of association between a new tag SNP in the FTO gene and BMI in Czech-Slavonic population. *Eur J Hum Genet.* 2010;18(12):1274. IF = 4.38

HUBACEK JA, STANEK V, GEBAUEROVÁ M, PILIPCINCOVÁ A, **DLOUHÁ D**, POLEDNE R, ASCHERMANN M, SKALICKÁ H, MATOUSKOVÁ J, KRUGER A, PENICKA M, HRABÁKOVÁ H, VESELKA J, HÁJEK P, LÁNSKÁ V, ADÁMKOVÁ V, PITHA J. A FTO variant and risk of acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta.* 2010;411(15-16):1069-72. IF = 2.67

Celkem reference autoroky:

Celkem IF: 32.97

PREZENTACE NA KONGERSECH/ CONFERENCE PRESENTATIONS

ČESKÉ/ CZECH

1. **Dlouhá D**, Piřha J, Adámková V, Lánská V, Hubáček JA, poster: „Variants within *HNFI α* and *ANGPTL4* genes and acute coronary syndrome in Czech population. The GENDEMIP study.“ XVI. kongres o ateroskleróze, Špindlerův Mlýn, 6. - 8. prosince 2012
2. **Dlouhá D**, Hubáček J A, Lánská V, Piřha J, poster: "Polymorfismus v genu *HNFI α* a jeho souvislost s akutním koronárním syndromem." XV. kongres o ateroskleróze, Špindlerův Mlýn, 1. - 3. 12. 2011
3. **Dlouhá D**, Suchánek P, Lánská V, Hubáček JA, poster: „Změna BMI u žen po krátkodobé intervenční studii nesouvisí s *FTO* polymorfismy“; Hubáček JA, Češka R, **Dlouhá D**, Vrablík M, Zlatohlávek L, „Vliv variant v genech *FTO* a *MC4R* na pokles tělesné hmotnosti po lázeňské léčbě u dětí a adolescentů.“ Obezitologie a bariatrie 2011“, Ostrava, 6. 10. - 8. 10. 2011
4. **Dlouhá D**, Adámková V, Šnejderlová M, Češka R, Vrablík M, Hubáček JA, poster: „Varianta v genu pro SLC01B1 transportér a účinnost léčby statiny.“ XVIII. kongres České internistické společnosti ČLS JEP, Praha, 25. - 28. 9. 2011
5. **Dlouhá D**, Adámková V, Šnejderlová M, Češka R, Vrablík M, Hubáček JA, poster: „Varianta v genu pro SLC01B1 transportér a účinnost léčby statiny.“ Rynekrová J, Fajt T, **Dlouhá D**, A. Hubacek JA, „Varianta genu pro *FTO* a riziko spontánních abortů.“ XIV. kongres o ateroskleróze Kongres České společnosti pro aterosklerózu, 9. - 11. 12. 2010, Špindlerův Mlýn
6. **Dlouha D**, Suchanek P, Lanska V, poster: „Body mass index change in females after short-time life style intervention is not dependent on the *FTO* polymorphisms“, Kongres „Výživa, nedílná součást léčby závažných chorob“. Poděbrady, 18. - 19. 11. 2010
7. **Dlouha D**, Hubacek J, přednáška/ oral presentation: „Gen pro *FTO* a jeho úloha pro rozvoj civilizačních onemocnění.“ Konference Centra výzkumu chorob srdce a cév, Harrachov, 10. - 12. 11. 2010
8. **Dlouhá D**, Adámková V, Tõnjes A, Kovacs P, Hubáček J, poster: „Varianta ve třetím intronu genu pro *FTO* a BMI v České populaci.“; Hubáček JA, Adámková V, Staněk V, Gebauerová M, Pilipčincová A, Poledne R, **Dlouhá D**, Aschermann M, Skalická H, Matoušková J, Kruger A, Pěnička M, Hrabáková H, Veselka J, Hájek P, Piřha J, „Gen pro *FTO* a riziko vzniku infarktu myokardu.“ XIII. kongres o ateroskleróze, Špindlerův Mlýn, 10. - 12. 12. 2009

MEZINÁRODNÍ/ INTERNATIONAL

9. **Dlouha D**, Hubacek JA, Adamkova V, Snejderlova M, Ceska R, Vrablik M, poster: „Association between common variants in the *SLCO1B1* gene and statin-induced myopathy.“; **Dlouha D**, Pitha J, Adamkova V, Lanska V, Hubacek JA, „Variants within *HNF1α* and *ANGPTL4* genes and acute coronary syndrome in Czech population. The GENDEMIP study.“ 10th International Congress on Coronary Artery Disease (ICCAD 2013), Florencie, 13. 10. – 16. 10. 2013
10. **Dlouhá D**, Piřha J, Adámková V, Lánská V, Hubáček JA, poster: „Variants within *HNF1α* and *ANGPTL4* genes and acute coronary syndrome in Czech population. The GENDEMIP study.“ RECOOP Bridges 8th Annual Scientific Meeting Prague, 5. - 7. 4. 2013
11. **Dlouha D**, Pitha J, Hubacek J, poster: „Association between *FTO* polymorphism and telomere length in middle aged females.“ 80th European Atherosclerosis Society congress, Miláno, Itálie, 25. - 28. 5. 2012 EAS 2012 Satellite Meeting: MicroRNA and cardiovascular diseases, Miláno, Itálie, 24. - 25. 5. 2012
12. **Dlouha D**, Hubacek J, Pitha J, poster: „Association between *FTO* polymorphism and telomere length in middle aged females.“ 9th international congress on coronary artery disease, Benátky, Itálie, 23. - 26. 10. 2011
13. **Dlouhá D**, Adámková V, Šnejderlová M, Česka R, Vrablik M, Hubáček JA, poster: „SCLO1B1 transporter and statin treatment efficacy.“ RECOOP Bridges 6th Annual Scientific Meeting Bratislava, 8. – 10. 4. 2011

ŽIVOTOPIS

NAROZENÁ 2. března 1978 v Havlíčkově Brodě

VZDĚLÁNÍ

od 2009 doktorské studium, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
2000 – 2004 magisterské studium, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, obor: Biochemie
1997 – 2000 bakalářské studium, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, obor: Klinická a toxikologická analýza

MEZINÁRODNÍ KURZY

březen 2010 týdenní studijní pobyt na University College London (UCL)
srpen 2011 týdenní intenzivní letní škola, Internationaltherosclerosis Research School in Prague (iARS)

ZAMĚSTNÁNÍ

od 2009 odborný pracovník, Institut klinické a experimentální medicíny v Praze, Centrum experimentální medicíny, Laboratoř pro výzkum aterosklerózy
2004 – 2009 rodičovská dovolená
2001 – 2004 odborný pracovník, 1. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, Ústav dědičných a metabolických poruch

ČLENSTVÍ VE VĚDECKÝCH SPOLEČNOSTECH

od 2009 ČSAT (Česká společnost pro aterosklerózu)

OCENĚNÍ

2012

2. cena ČSAT za nejlepší publikovanou původní práci za rok 2011/ 2012

„Association between *FTO* 1st intron tagging variant and telomere length in middle age females.3PMFs study. Clin Chim Acta 2012“ XVI.

kongres o ateroskleróze, Špindlerův Mlýn, 6. – 8. prosince 2012

CURRICULUM VITAE

BORN ON 2nd March 1978 in Havlíčkův Brod

EDUCATION

since 2009 Doctoral studies, Charles University in Prague, Faculty of Science

2000 – 2004 Master studies, Charles University in Prague, Faculty of Science; branch: Biochemistry

1997 – 2000 Bachelor studies, Charles University in Prague, Faculty of Science; branch: Clinical and Toxicological Analysis

INTERNATIONAL COURSE

March 2010 study stay (1 week) at the University College London

August 2011 study stay (1 week), International Atherosclerosis Research School in Prague (iARS)

EMPLOYMENT

since 2009 researcher, Institute for Clinical and Experimental Medicine in Prague, Center for Experimental Medicine, Laboratory for Atherosclerosis Research

2004 – 2009 maternity leave

2001 – 2004 researcher, the 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Institute for Inherited Metabolic Disorders

MEMBERSHIP IN SCIENTIFIC ASSOCIATIONS

since 2009 Czech Atherosclerosis Society

AWARDS

2012

Price for the second best article in year 2011/ 2012 „Association between *FTO* 1st intron tagging variant and telomere length in middle age females. 3PMFs study. Clin Chim Acta 2012.“ 16th Atherosclerosis Congress, Špindlerův Mlýn, December 6 – 8, 2012