

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Program: Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie



**Studium genetických a infekčních rizikových faktorů v patogenezi
obezity u českých adolescentů**

Study of genetic and infectious risk factors in the pathogenesis of
obesity in Czech adolescents

Dizertační práce

Mgr. Lenka Dušátková

Školitel: RNDr. Hana Zamrazilová, Ph.D.

Endokrinologický ústav v Praze

Praha 2016

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 dne

Mgr. Lenka Dušátková

Poděkování

Ráda bych poděkovala především své školitelce RNDr. Haně Zamrazilové, Ph.D. za odborné vedení dizertační práce, kamarádský přístup, povzbuzení a čas, který mi věnovala v průběhu celého studia.

Upřímně děkuji také doc. MUDr. Vojtěchu Hainerovi, CSc a MUDr. Ireně Aldhoon-Hainerové, Ph.D. za odborné konzultace, cenné rady, ale i přátelský přístup. Dík patří také oddělením Obezitologie a Molekulární endokrinologie Endokrinologického ústavu v Praze za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě děkuji své rodině a blízkým, bez jejichž pomoci a pochopení by tato práce nemohla vzniknout.

Dizertační práce vznikala za finančního přispění grantu z Norska prostřednictvím Norského finančního mechanismu (CZ 0123), grantů interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví (IGA MZ NT/13792, NT/12342) a Grantové agentury Univerzity Karlovy (GA UK 370911).

Abstrakt

Prevalence obezity i přidružených kardiometabolických komplikací u dětí je celosvětově vysoká. Obezita je multifaktoriální onemocnění, které vzniká zejména vlivem nepříznivých faktorů vnějšího prostředí v interakci s faktory genetickými. Celogenomové asociační studie odhalily desítky jednonukleotidových polymorfismů asociovaných s obezitou. Zvažována je i kauzální role infekce v patogenezi obezity, zejména prostřednictvím lidského adenoviru 36 (Adv36). Cílem dizertační práce bylo prověřit možné asociace vybraných polymorfismů kandidátních genů pro obezitu (*TMEM18*, *SH2B1*, *KCTD15*, *PCSK1*, *BDNF*, *SEC16B*, *MC4R*, *FTO*) a infekce Adv36 ve vztahu k fenotypovým charakteristikám obezity a jejím komplikacím u české dospívající populace. Výsledky jsou popsány v celkem osmi publikacích, z nichž je šest původních prací a dvě rešerše. Dílčí studie byly provedeny jak na reprezentativním vzorku české adolescentní populace (1 533 jedinců epidemiologické studie), tak u adolescentů s nadměrnou hmotností, kteří podstoupili redukční lázeňskou nebo ambulantní terapii (562 jedinců intervenční studie). Výsledky analýz prokázaly souvislost genových variant *TMEM18*, *SEC16B* a *FTO* s obezitou. Popsána byla rovněž spojitost variant genů zapojených do hypothalamické regulace energetické rovnováhy – *MC4R*, *BDNF* a *PCSK1* – s výskytem metabolického syndromu, příjmem jednotlivých nutrientů či infekcí Adv36. Potvrzena byla také asociace mezi přítomností protilátek proti Adv36 s obezitou, zejména pak s nadváhou. Adv36 pozitivita dále ovlivňovala úspěšnost redukčního programu. Závěry předkládané práce podporují význam genetických i infekčních faktorů v patogenezi obezity.

Klíčová slova: obezita, adolescence, celogenomové asociační studie, jednonukleotidové polymorfismy, infekce, adenovirus 36, metabolický syndrom, redukční program

Abstract

The prevalence of obesity and its related cardiometabolic complications in children remains high across the world. Obesity is a multifactorial disease caused by interaction between genes and environmental factors. Genome-wide association studies have discovered several single nucleotide polymorphisms associated with obesity. A causal role of infection in the pathogenesis of obesity has also been considered, particularly the role of adenovirus 36 (Adv36). The aim of the Ph.D. thesis was to investigate the associations of obesity susceptibility loci (*TMEM18*, *SH2B1*, *KCTD15*, *PCSK1*, *BDNF*, *SEC16B*, *MC4R*, *FTO*) and Adv36 infection with obesity-related characteristics and complications in the Czech adolescent population. The results are described in eight publications, of which six are original papers and two are reviews. Studies were performed on a cohort of Czech adolescents recruited either from the general population (1,533 individuals from the epidemiological study) and from in-patient or outpatient weight management clinics (562 overweight/obese individuals underwent an intervention). The results demonstrated an association of *TMEM18*, *SEC16B* and *FTO* gene variants with obesity. Some variants of the genes involved in hypothalamic regulation of energy homeostasis – *MC4R*, *BDNF*, *PCSK1* – were related to metabolic syndrome, individual nutrient intake or Adv36 infection. A relationship of Adv36 antibodies with obesity, and especially with overweight, was further confirmed. Moreover, Adv36 positivity was associated with the response to weight management. Conclusions of this Ph.D. thesis support the importance of genetic and infectious factors in the pathogenesis of obesity.

Keywords: obesity, adolescence, genome-wide association studies, single nucleotide polymorphism, infection, adenovirus 36, metabolic syndrome, weight management

Obsah

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Abstrakt | 4 |
| Abstract | 5 |
| Seznam zkratk | 8 |
| 1 Úvod | 9 |
| 1.1 Cíle dizertační práce | 10 |
| 2 Literární přehled | 11 |
| 2.1 Obezita u dětí a adolescentů | 11 |
| 2.2 Etiopatogeneze obezity | 12 |
| 2.2.1 Energetická rovnováha | 12 |
| 2.2.2 Rizikové faktory | 14 |
| 2.3 Genetické pozadí obezity | 15 |
| 2.3.1 Monogenní a polygenní obezita | 15 |
| 2.3.2 Celogenomové asociační studie | 16 |
| 2.3.3 Polymorfismy a kandidátní geny zkoumané v dizertační práci | 20 |
| 2.3.4 Vztah polymorfismů kandidátních genů k fenotypovým charakteristikám | 24 |
| 2.4 Lidský adenovirus 36 | 25 |
| 3 Soubor a shrnutí metodiky | 28 |
| 4 Publikace | 30 |
| 4.1 Asociace polymorfismů kandidátních genů pro obezitu s metabolickým syndromem a přidruženými parametry u 1 443 českých adolescentů | 30 |
| 4.2 Glukózová homeostáza a inzulínová rezistence: prevalence, pohlavní rozdíly a prediktory u adolescentů | 43 |
| 4.3 Běžná varianta genu <i>BDNF</i> je asociovaná s příjmem vápníku u adolescentů | 53 |
| 4.4 Klinické a laboratorní charakteristiky 1 179 českých adolescentů s ohledem na přítomnost protilátek proti adenoviru 36 | 62 |
| 4.5 Infekce adenovirem 36: role v dietním příjmu a úspěšnosti lázeňského redukčního programu u obézních dívek | 70 |
| 4.6 Asociace infekce adenovirem 36 s variantami kandidátních genů pro obezitu u adolescentů | 75 |
| 4.7 Gen pro <i>FTO</i> a jeho role v genetické determinaci obezity – editorial | 82 |
| 4.8 Genetické pozadí běžných forem obezity – od studií identických dvojčat po studium kandidátních genů obezity | 85 |
| 5 Diskuze | 93 |
| 5.1 Polymorfismy kandidátních genů pro obezitu ve vztahu k tělesné hmotnosti a tělesnému složení u českých adolescentů | 93 |

| | | |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.2 | Přítomnost protilátek proti adenoviru 36 a jejich vztah k tělesné hmotnosti a obezitě u českých adolescentů..... | 94 |
| 5.3 | Asociace polymorfismů kandidátních genů a Adv36 k metabolickým komplikacím obezity..... | 95 |
| 5.4 | Energetický příjem českých adolescentů ve vztahu k polymorfismům kandidátních genů a Adv36 | 97 |
| 5.5 | Role infekce Adv36 v úspěšnosti redukčního režimu..... | 99 |
| 5.6 | Interakce genetických a infekčních rizikových faktorů a jejich význam v patogenezi obezity | 99 |
| 6 | Závěr..... | 101 |
| 7 | Seznam použité literatury..... | 102 |

Seznam zkratek

| | |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Adv36 | adenovirus 36 |
| AgRP | agouti-related neuropeptid (agouti-related neuropeptide) |
| BDNF | (brain-derived neurotrophic factor) |
| BMI | index tělesné hmotnosti (body mass index) |
| ELISA | (enzyme-linked immunosorbent assay) |
| FTO | (fat mass and obesity associated) |
| GWAS | celogenomové asociační studie (genome-wide association studies) |
| HDL | lipoprotein o vysoké denzitě (high density lipoprotein) |
| HOMA-IR | homeostatický model inzulinové rezistence (homeostasis model assessment-estimated insulin resistance) |
| IRX3 | (iroquois homeobox 3) |
| KCTD15 | (potassium channel tetramerization domain containing 15) |
| LDL | lipoprotein o nízké denzitě (low density lipoprotein) |
| LEP | leptin |
| LEPR | leptinový receptor (leptin receptor) |
| MC3R | melanokortinový receptor 3. typu (melanocortin 3 receptor) |
| MC4R | melanokortinový receptor 4. typu (melanocortin 4 receptor) |
| NPY | neuropeptid Y (neuropeptide Y) |
| NTRK2 | (neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2) |
| PC1/3 | konvertáza prohormonu 1/3 (prohormone convertase 1/3) |
| PCSK1 | (proprotein convertase subtilisin/kexin type 1) |
| POMC | proopiomelanokortin (proopiomelanocortin) |
| RPGRIP1L | (retinitis pigmentosa GTPase regulator-interacting protein-1 like) |
| SIM1 | (single-minded family bHLH transcription factor 1) |
| SEC16B | (SEC16 homolog B, endoplasmic reticulum export factor) |
| SH2B1 | (Src-homology-2 /SH2/ domain containing putative adaptor protein 1) |
| SNP | jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism) |
| TMEM18 | (transmembrane protein 18) |
| TrkB | tyrosin kinázový receptor B (tyrosine kinase receptor B) |
| T2DM | diabetes mellitus 2. typu (type 2 diabetes mellitus) |
| WHR | poměr obvodu pasu a boků (waist to hip ratio) |
| α -MSH | α -melanocyt-stimulující hormon (alpha-melanocyte-stimulating hormone) |

1 Úvod

Nadměrná tělesná hmotnost je spojena s výskytem přidružených zdravotních komplikací, které se často vyskytují již u dětí a dospívajících. Obezita významně zvyšuje riziko kardiometabolických poruch, včetně rozvoje diabetu mellitu 2. typu (T2DM) a metabolického syndromu. Příčinou vzniku běžné obezity je pozitivní energetická bilance, kdy příjem energie převáží nad výdejem. Celosvětovou epidemii obezity nicméně nelze přisuzovat pouze změnám životního stylu charakterizovaným zvýšeným energetickým příjmem, nevhodnou skladbou jídelníčku a nedostatečnou fyzickou aktivitou.

Obezita patří mezi multifaktoriální onemocnění. Na jejím vzniku se zásadní měrou podílí genetické pozadí, které v interakci s faktory vnějšího prostředí determinuje základní fyziologické procesy od metabolismu živin, adipogeneze až po regulaci energetické homeostázy. Průlomem ve výzkumu obezity bylo zavedení celogenomových asociačních studií (GWAS), které identifikovaly řadu jednonukleotidových polymorfismů (SNPs) kandidátních genů souvisejících s indexem tělesné hmotnosti (BMI) v populaci. V poslední dekádě je významně diskutována rovněž úloha infekce v etiopatogenezi obezity. Z dosud studovaných infekčních agens se nejvlivnějším zdá být lidský adenovirus 36 (Adv36), jenž způsobuje zmnožení tukové tkáně u experimentálně infikovaných zvířat a byla u něj prokázána souvislost s obezitou také u lidí.

Předkládaná dizertační práce se zaměřuje na studium rizikových faktorů obezity, z nichž většina nebyla v České republice podrobně zkoumána – polymorfismy kandidátních genů pro obezitu *TMEM18*, *SH2B1*, *KCTD15*, *PCSK1*, *BDNF*, *SEC16B*, *MC4R*, *FTO* a infekci Adv36. Práce využívá rozsáhlý a podrobně fenotypově charakterizovaný soubor adolescentů, který umožnil zkoumat tyto faktory nejen ve vztahu k obezitě, ale i dalším parametrům úzce souvisejícím s obezitou. Součástí dizertační práce je osm publikací, z nichž šest je původních prací a dvě české rešerše.

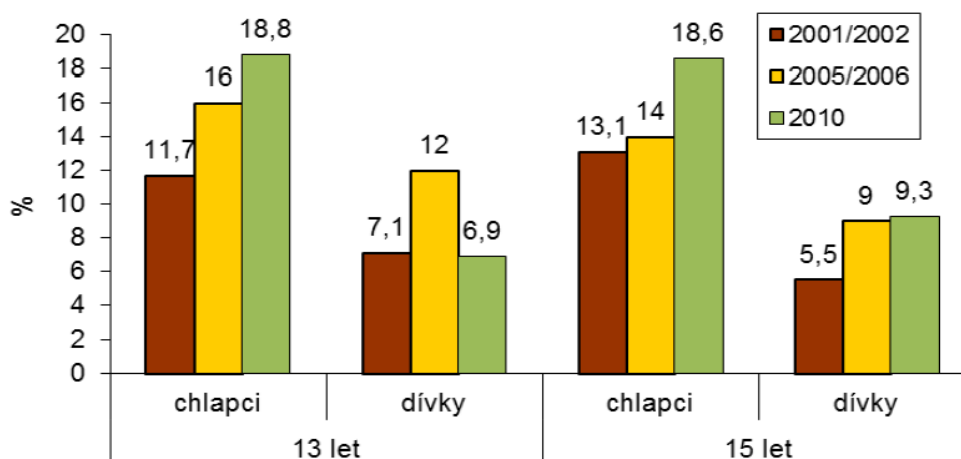
1.1 Cíle dizertační práce

1. U českých adolescentů popsat vztah vybraných polymorfismů kandidátních genů pro obezitu k:
 - tělesné hmotnosti a tělesnému složení,
 - metabolickým parametrům a komplikacím obezity,
 - energetickému příjmu.
2. U českých adolescentů analyzovat přítomnost protilátek proti lidskému adenoviru 36 ve vztahu k:
 - tělesné hmotnosti a úspěšnosti její redukce,
 - metabolickým a hormonálním parametrům,
 - energetickému příjmu,
 - nosičství rizikových alel kandidátních genů pro obezitu.

2 Literární přehled

2.1 Obezita u dětí a adolescentů

Obezita patří mezi nejrozšířenější metabolická onemocnění postihující dospělou i dětskou populaci po celém světě. Navzdory intenzivním preventivním a intervenčním strategiím v posledních letech prevalence obezity u dětí a adolescentů stoupá. I když se v některých západních evropských zemích a USA podařilo tento trend zastavit, výskyt nadváhy a obezity zůstává velmi vysoký – např. u dospívajících ve věku 12–19 let až 35 % (Ahluwalia et al. 2015, Ogden et al. 2014). Také v České republice se počet dětí s nadměrnou tělesnou hmotností během posledních deseti let zvyšoval. Z dat studie „The Health Behaviour in School-aged Children“ pro Světovou zdravotnickou organizaci vyplynulo, že zatímco v roce 2001 mělo nadváhu a obezitu 13 % 15letých chlapců a 5,5 % dívek, v roce 2010 to bylo již 19 % chlapců a 9 % dívek (Obrázek 1) (Puklová 2013).



Obrázek 1. Podíl dětí s vyšší než normální hmotností (převzato z Puklová 2013)

Obezita významně zvyšuje riziko vzniku T2DM, ischemické choroby srdeční či některých typů nádorů a sekundárně se tak řadí mezi nejčastější příčiny úmrtí v rozvinutých zemích (Borrell & Samuel 2014, Hainer 2011). Bylo zjištěno, že se rizikové kardiometabolické ukazatele mohou vyskytovat již u dětí a dospívajících (Lambert et al. 2008). Metabolický syndrom definovaný abdominální obezitou, dyslipidémií, glukózovou intolerancí a hypertenzí (Zimmet et al. 2007) lze diagnostikovat u dětí se stále vyšší

prevalencí (Bokor et al. 2008). Pravděpodobnost, že bude obézní dospívající obézním i v dospělosti je až 60% (Guo et al. 2002). Rovněž obezita u rodičů zdvojnásobuje výskyt obezity u potomků (Whitaker et al. 1997). Obezita se tak stává celosvětovým zdravotním i ekonomickým problémem, kterému je třeba se věnovat.

2.2 Etiopatogeneze obezity

Obezita je definovaná zmožením tukové tkáně v důsledku energetické nerovnováhy, kdy energetický příjem převáží nad výdejem. Faktory zodpovědné za tuto nerovnováhu jsou endogenního i exogenního charakteru a souběžně ovlivňují neuroendokrinní regulaci energetické bilance a následně tělesnou hmotnost (Hainer 2011).

2.2.1 Energetická rovnováha

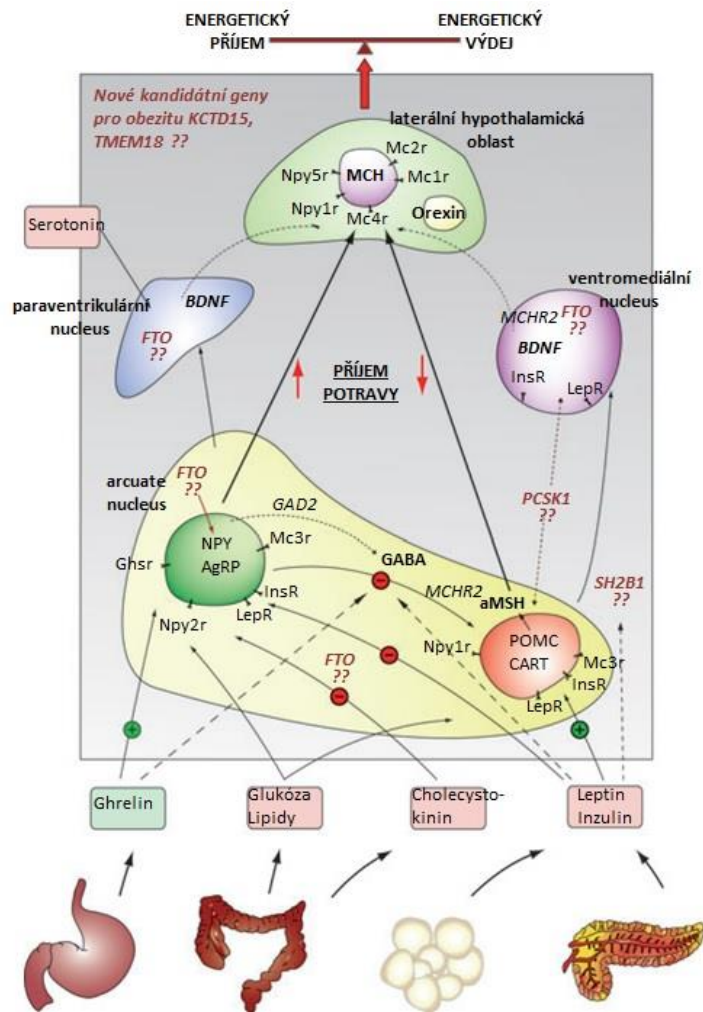
Energetický příjem je definován množstvím a složením základních živin v potravě. Nejvíce jej ovlivňuje příjem tuků, které mají nejvyšší energetickou hodnotu. Klidový energetický výdej slouží k zachování základních životních funkcí organismu. Na celkovém výdeji se podílí z 55–70 % a je také nejvíce geneticky determinován. Postprandiální energetický výdej (8–12 %) souvisí s trávením, vstřebáváním živin a aktivací sympatického nervového systému po jídle. Třetí součástí energetického výdeje je pohybová aktivita, která v závislosti na typu a intenzitě představuje 20–40 % (Hainer 2011).

Energetická rovnováha je řízena centrální nervovou soustavou, resp. hypotalamem, kde dochází k interakci periferních signálů z tukové tkáně a gastrointestinálního traktu s hormony nervové tkáně – neuropeptidy (Obrázek 2). V nucleus arcuatus hypotalamu se nacházejí dvě hlavní populace neuronů, z nichž jedna exprimuje tzv. anorexigenní neuropeptidy, které stimulují centrum sytosti ve ventromediální části hypotalamu a snižují tak energetický příjem. Druhá subpopulace naopak exprimuje orexigenní neuropeptidy aktivující laterální část hypotalamu, kde se nachází centrum hladu – tyto neuropeptidy tak stimulují příjem potravy a inhibují energetický výdej (Stanley et al. 2005).

Orexigenní neuropeptidy – agouti-related neuropeptid (AgRP), neuropeptid Y (NPY) a anorexigenní neuropeptid proopiomelanokortin (POMC) a melanokortinový receptor 4. typu (MC4R) jsou součástí tzv. melanokortinového systému, který je klíčový pro udržení

energetické bilance (Obrázek 2). Štěpením POMC vzniká mimo jiné α -melanocyt-stimulující hormon (α -MSH), který se váže na MC4R a ve výsledku snižuje energetický příjem a zvyšuje výdej. NPY/AgRP působí na MC4R antagonisticky (Kim et al. 2014). MC4R ovlivňuje expresi další anorexigenní molekuly – brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ve ventromediálním hypotalamu, který je tak součástí melanokortinové signalizační kaskády distálně od MC4R (Xu et al. 2003).

Mezi periferní signály regulující příjem potravy patří hormony tukové tkáně (leptin, adiponektin), gastrointestinálního traktu (ghrelin, cholecystokinin, glukagon-like peptid-1), pankreatu (inzulin) a další (Obrázek 2). Leptin je anorexigenní hormon, který aktivuje neuropeptid POMC a inhibuje NPY/AgRP (Cowley et al. 2001). Ghrelin, tzv. hormon hladu, je produkován endokrinní tkání žaludku a zvyšuje expresi NPY/AgRP a stimuluje tak příjem potravy (Chen et al. 2004). Další hormony trávicího traktu – cholecystokinin či glukagon-like peptid-1 působí anorexigenně jako signály sytosti (Chaudhri et al. 2006). Exprese inzulinových receptorů v oblasti hypotalamu naznačuje důležitou roli inzulinu také v regulaci energetické homeostázy. Jedná se o anorexigenní signál tlumící energetický příjem, nicméně přesný mechanismus účinku je stále nejasný (Kim et al. 2014).



Obrázek 2. Regulace energetické rovnováhy v hypothalamu (převzato a upraveno z van Vliet-Ostaptchouk et al. 2009)

2.2.2 Rizikové faktory

Změna životního stylu charakterizovaná nedostatečnou fyzickou aktivitou a nadměrným energetickým příjmem je považována za klíčový exogenní faktor zodpovědný za současnou epidemii obezity u dospělé i dětské populace (Hjorth et al. 2014, Niemeier et al. 2006). Přičemž významnější vliv než samotný energetický příjem má složení stravy a jídelní návyky (Niemeier et al. 2006). Některé studie popisují nižší celkový energetický příjem u obézních adolescentů oproti jedincům s normální tělesnou hmotností (Hassapidou et al. 2006, Skinner et al. 2012), ale například také vyšší konzumaci drobného občerstvení (Hassapidou et al. 2006). Rizikovým faktorem vnějšího prostředí může být i nedostatek spánku nebo doba strávená u televize (Braithwaite et al. 2013, Hjorth et al. 2014).

Genetické (endogenní) faktory determinují metabolický a endokrinní systém, který reguluje energetickou rovnováhu, metabolismus základních živin, adipogenezi a v interakci s faktory vnějšího prostředí ovlivňují tělesnou hmotnost (Hainer 2011). Genetické faktory tak hrají zásadní roli v etiopatogenezi obezity a jsou podrobně diskutovány v kapitole 2.3.

Vedle změn životního stylu a genetických predispozic jsou zvažovány i další méně známé faktory, které se mohou na patogenezi obezity podílet. Jedná se například o infekční agens. U obézních jedinců byla nalezena vyšší prevalence určitých druhů bakterií, například *Chlamydia pneumoniae* (Lajunen et al. 2011), *Helicobacter pylori* (Arslan et al. 2009), *Neisseria meningitidis* (Uberos et al. 2010). Obezita je také spojována se závažnějším průběhem virové infekce (Almond et al. 2013, Garcia et al. 2015). Tyto důkazy spíše upozorňují na zvýšenou náchylnost obézních jedinců k infekci v důsledku zhoršené imunitní odpovědi, ke které při akumulaci tělesného tuku dochází (Karlsson et al. 2010, Tanaka et al. 1993). Nicméně infekční agens mohou hrát i kauzální roli v etiopatogenezi obezity. Bylo zjištěno, že některé lidské adenoviry zvyšují akumulaci tělesného tuku u experimentálně infikovaných zvířat (Dhurandhar et al. 2000). S rozvojem obezity u lidí je nejvíce spojován Adv36 (Atkinson et al. 2005). Této problematice je věnována kapitola 2.4.

2.3 Genetické pozadí obezity

Tělesná hmotnost je determinována genetickými faktory ze 40–70 %, jak ukázaly studie na dvojčatech (Allison et al. 1996, Stunkard et al. 1986). Míra heritability se také během dětství postupně zvyšuje (z 0,47 při narození na 0,76 v 11 letech) (Choh et al. 2014). Dědičná složka se uplatňuje i u dalších parametrů souvisejících s obezitou, ovlivňuje například distribuci tělesného tuku (Katzmarzyk et al. 2000), složení mastných kyselin v séru (Kunesová et al. 2002), míru hmotnostní redukce (Hainer et al. 2000), ale i energetický příjem (Faith et al. 1999) či jídelní chování (Rutherford et al. 1993).

2.3.1 Monogenní a polygenní obezita

Na základě dědičnosti můžeme obezitu rozdělit na dva typy – monogenní a polygenní „běžnou“ obezitu. Monogenně podmíněná obezita je vzácné onemocnění, které se manifestuje již v raném dětství nezávisle na prostředí a je způsobeno mutací v jediném genu. První identifikované mutace v genech pro leptin (*LEP*) a leptinový receptor (*LEPR*) vedly k

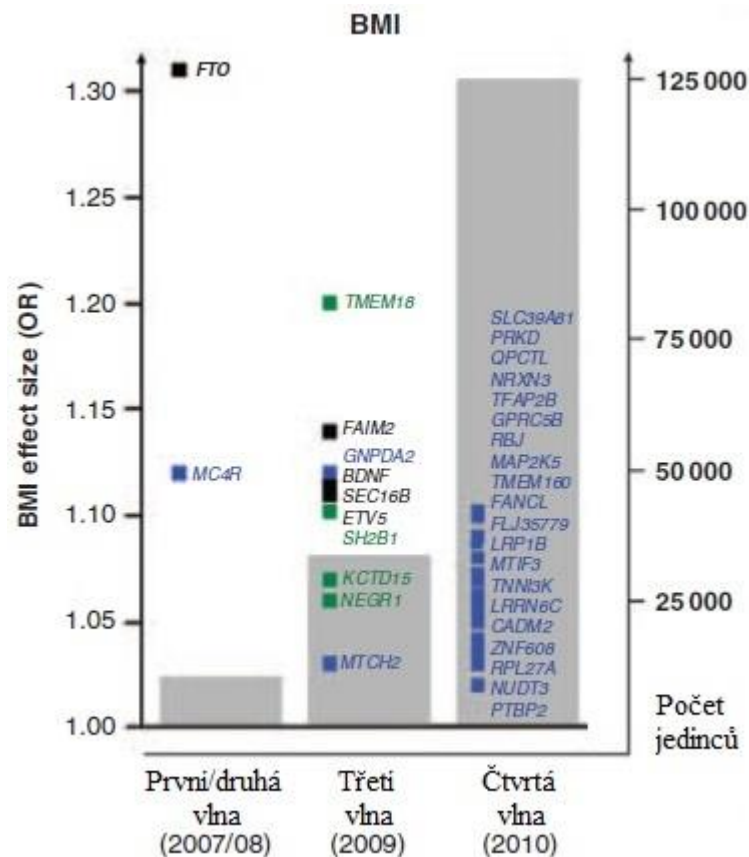
leptinové deficienci, hyperfágií a nárůstu tělesné hmotnosti (Clément et al. 1998, Montague et al. 1997). Nejčastěji se vyskytují mutace v genu pro melanokortinový receptor 4. typu (*MC4R*) – u českých obézních dětí je prevalence těchto mutací 2,4 % (Hainerová et al. 2007). Dále jsou mutace nacházeny v genech *PCSK1*, *POMC*, *NTRK2*, *BDNF* a *SIMI* (Aldhoon-Hainerová et al. 2014). Všechny tyto geny jsou zapojené do leptin-melanokortinové signalizační dráhy (Obrázek 2), proto jejich identifikace a následné experimentální studie na zvířatech pomohly naznačit patofyziologické mechanismy regulace energetické bilance v hypotalamu (Hinney et al. 2014).

Na polygenním typu dědičnosti se podílí velké množství genů a genových variant malého účinku, které interagují nejen mezi sebou, ale i s faktory vnějšího prostředí. Z tohoto důvodu je výzkum genetického pozadí běžné obezity poměrně komplikovaný. Před érou GWAS byl výzkum zaměřen na tzv. kandidátní geny, u kterých se předpokládal vliv na patogenezi onemocnění. Tyto geny byly vytipovány na základě experimentálních studií zvířat nebo vazebných analýz, které vyhledávají oblasti kosegregující se zkoumaným znakem. Díky těmto strategiím bylo do roku 2005 identifikováno 127 kandidátních genů pro obezitu (Rankinen et al. 2006), nicméně žádný nebyl dostatečně validován (Saunders et al. 2007). Výjimkou je gen *PCSK1* (Benzinou et al. 2008), který bude podrobněji popsán v kapitole 2.3.3.

2.3.2 Celogenomové asociační studie

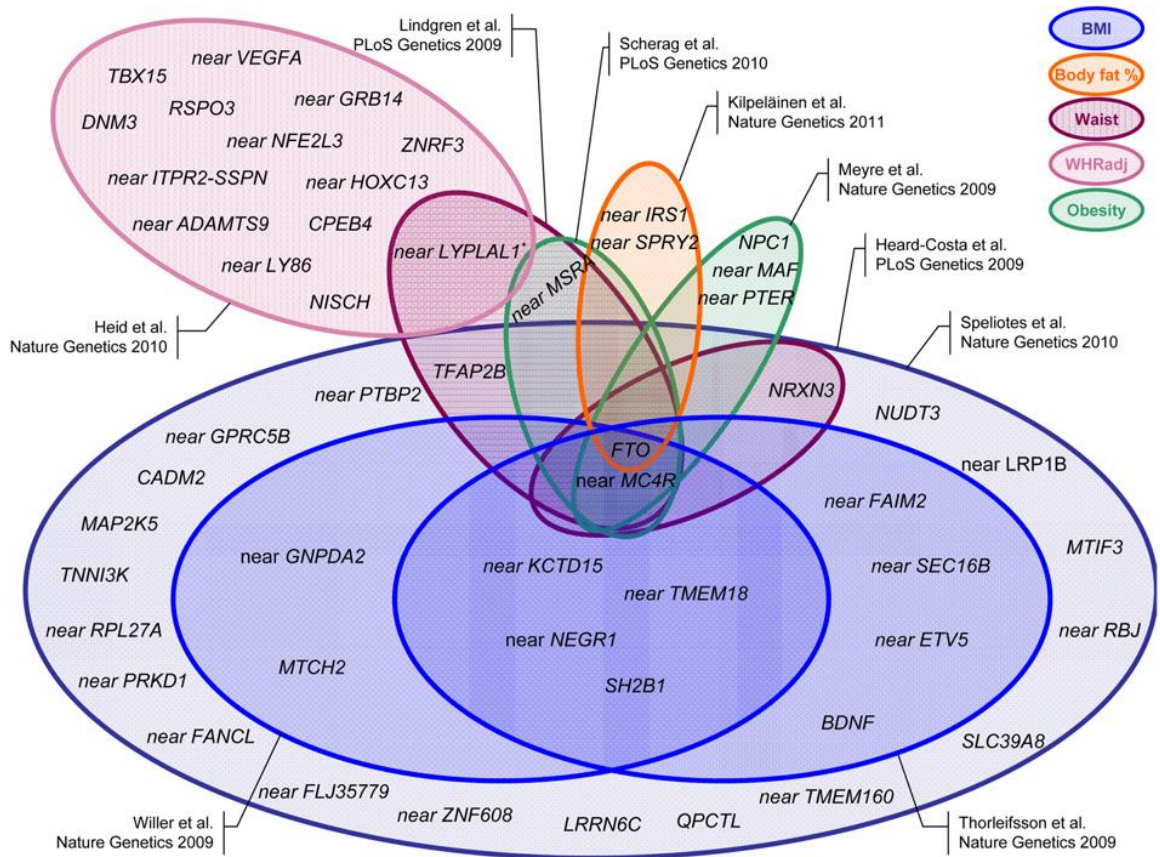
Díky poznatkům o variabilitě lidského genomu (International HapMap Consortium 2005) a pokročilým čipovým genotypizačním technologiím byla zavedena úspěšná metoda pro výzkum komplexních znaků a onemocnění – GWAS. Tato metoda funguje na principu detekce jednonukleotidových polymorfismů rozmístěných v rámci celého genomu. 500 000 až 1 600 000 polymorfismů v jedné analýze zachytí až 80 % běžné variability genomu (Barrett & Cardon 2006, International HapMap Consortium 2005). GWAS identifikují polymorfismy asociované se sledovaným znakem či onemocněním na rozsáhlých populačních souborech. Varianty jsou považované za celogenomově signifikantní, pokud dosáhnou hladiny významnosti $p < 5 \times 10^{-8}$, což odpovídá 1 000 000 nezávislým testům provedeným v jedné analýze. Nalezené asociace by poté měly být verifikovány meta-analýzami a nezávislými studiemi na různých populacích (Sandholt et al. 2012).

GWAS, které zkoumaly vliv genových variant na BMI můžeme rozdělit do čtyř vln probíhajících v letech 2007 až 2010 (Obrázek 3). V první vlně byl objeven gen *FTO*, který je dosud nejvýznamnějším a nejreplikovanějším výsledkem GWAS (Frayling et al., Dina et al. 2007). Posléze byly identifikovány varianty genu *MC4R* asociované s BMI (Loos et al. 2008). Ve třetí vlně, představované zejména dvěma rozsáhlými studii GIANT a deCODE byla nejen potvrzena vazba obou předešlých genů k BMI, ale byly popsány i další genové lokusy (Thorleifsson et al. 2009, Willer et al. 2009). Po čtvrté vlně, ve které bylo potvrzeno 32 genových variant asociovaných s BMI (Speliotes et al. 2010), nastala delší odmlka spojená s prováděním nezávislých replikačních studií, asociačními analýzami zaměřenými na jiné fenotypové charakteristiky a s experimentálními studii objevených genů. Nejnovější a zároveň nejrozsáhlejší GWAS byla publikována v roce 2015. V souboru téměř 340 tisíc jedinců bylo identifikováno 97 lokusů významně asociovaných s BMI, z nichž 56 bylo popsáno poprvé. Tyto lokusy vysvětlují přibližně 2,7 % celkové variability BMI a jednotlivé alely v průměru zvyšují BMI o 0,1 kg/m³, tělesnou hmotnost o 260–320 g na 160–180 cm tělesné výšky (Locke et al. 2015).



Obrázek 3. Kandidátní geny pro obezitu objevené v jednotlivých vlnách GWAS. Počet identifikovaných genů koreloval s nárůstem vyšetřovaných jedinců a poklesem efektu na BMI (převzato a upraveno z Sandholt et al. 2012).

Výše zmíněné studie byly realizovány na populaci evropského původu. GWAS byly ovšem provedeny i u jiných etnických skupin, například východoasijské (Wen et al. 2014) či africké (Monda et al. 2013). Celogenomové významnosti tam dosáhly nové i již známé lokusy, zahrnující geny *FTO* a *MC4R*. GWAS analyzovaly vliv genových variant na extrémní obezitu, kde se porovnávali jedinci s vysokým stupněm obezity ($BMI \geq 35$ nebo ≥ 99 . percentil) se zdravými kontrolami (Paternoster et al. 2011, Scherag et al. 2010) nebo na další fenotypové charakteristiky, jako je obvod pasu (Lindgren et al. 2009), poměr pasu a boků (WHR) (Heid et al. 2010, Lindgren et al. 2009) či množství tělesného tuku (Kilpeläinen et al. 2011b). Efekt objevených genů k tělesným parametrům se překrývá (Obrázek 4). Zejména u WHR byly také objeveny rozdíly mezi pohlavím (Heid et al. 2010, Randall et al. 2013).



Obrázek 4. Kandidátní geny pro obezitu, které byly objevené na základě GWAS mající vliv na různé tělesné charakteristiky (převzato z Loos 2012)

V roce 2011 byl u dětí a adolescentů potvrzen vztah k BMI u 9 z 32 polymorfismů kandidátních genů pro obezitu (Zhao et al. 2011). Varianty však vysvětlují pouze 1,12 % celkové variability z-skóre BMI (Zhao et al. 2009). Jejich efekt na BMI se mírně liší oproti dospělé populaci – v případě genů *SEC16B*, *TMEM18* a *KCTD15* byl u dětí vyšší a u *BDNF* naopak nižší (den Hoed et al. 2010). Jak již bylo zmíněno, dědičnost BMI se s věkem zvyšuje (Choh et al. 2014), proto se předpokládá, že i asociace jednotlivých rizikových alel se může s věkem měnit. Podle britské longitudinální studie měly rizikové alely kandidátních genů pro obezitu nejvyšší vliv na tělesnou hmotnost ve věku 11 a 20 let (Elks et al. 2012). Nedávno byla také provedena první GWAS zaměřená na změny BMI během dětství. Studie popsala čtyři polymorfismy známé z předchozích asociačních studií, které ovlivňují také změny/nárůst BMI během dětství (Warrington et al. 2015).

2.3.3 Polymorfismy a kandidátní geny zkoumané v dizertační práci

V dizertační práci bylo studováno až jedenáct polymorfismů objevených GWAS (Tabulka 1). Pouze polymorfismy genu *PCSK1* byly identifikovány podrobnou analýzou genu, který byl vytipován díky strategii kandidátního genu a vazebných analýz (Benzinou et al. 2008).

Tabulka 1. Polymorfismy kandidátních genů pro obezitu zkoumané v dizertační práci

| <i>Gen</i> | <i>SNP</i> | <i>Typ SNP</i> | <i>Frekvence rizikové alely (%)¹</i> | <i>Vliv na BMI (kg/m²)</i> | <i>Riziko k obezitě (OR; 96% CI)</i> | <i>Primární studie</i> |
|---------------|------------|--------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------|
| <i>FTO</i> | rs9939609 | intronový | 41 | 0,36 | 1,31 (1,23; 1,39) | (Frayling et al. 2007) |
| <i>MC4R</i> | rs12970134 | intergenní | 27 | 0,25 | - | (Chambers et al. 2008) |
| | rs17782313 | intergenní | 24 | 0,22 | 1,12 (1,08; 1,16) | (Loos et al. 2008) |
| <i>PCSK1</i> | rs6232 | kódující | 3 | - | 1,15 (1,06; 1,24) ³ | (Benzinou et al. 2008) |
| | rs6235 | kódující | 26 | - | 1,07 (1,04; 1,10) ³ | (Benzinou et al. 2008) |
| <i>BDNF</i> | rs925946 | intergenní | 29 | - | 1,11 (1,05; 1,16) | (Thorleifsson et al. 2009) |
| | rs4923461 | intergenní | 78 | 0,19 ² | - | (Thorleifsson et al. 2009) |
| <i>TMEM18</i> | rs7561317 | intergenní | 83 | 0,19 ² | 1,20 (1,13; 1,27) | (Thorleifsson et al. 2009) |
| <i>SH2B1</i> | rs7498665 | kódující | 33 | 0,15 | 1,11 (1,06; 1,17) | (Willer et al. 2009) |
| <i>KCTD15</i> | rs29941 | intergenní | 67 | 0,17 ² | 1,10 (1,04; 1,15) | (Thorleifsson et al. 2009) |
| <i>SEC16B</i> | rs10913469 | intergenní | 18 | 0,11 ² | 1,11 (1,05; 1,18) | (Thorleifsson et al. 2009) |

¹Evropská populace z databáze 1000 Genomes. ²Data z replikačních studií shrnutých v (Loos 2009). ³Data z nejnovější meta-analýzy běžné populace (Nead et al. 2015).

Gen ***FTO*** (**fat mass and obesity associated**) byl v roce 2007 prvním identifikovaným kandidátním genem pro obezitu pomocí GWAS. Je silně exprimován v oblastech hypotalamu, což naznačuje jeho roli v regulaci energetické rovnováhy (Gerken et al. 2007), nicméně přesná funkce tohoto genu je stále předmětem zkoumání. Jedná se o gen 16. chromozomu (16q12.2) kódující 2-oxyglutarát Fe(II) dependentní demetylázu s vyšší afinitou k RNA než DNA (Gerken et al. 2007, Han et al. 2010). U myšího modelu vedla inaktivace genu *FTO* k postnatální růstové retardaci a redukci tukové i netukové tkáně (Fischer et al. 2009). Naopak zvýšená exprese genu *FTO* byla asociovaná s vyšším energetickým příjmem a nárůstem tělesné hmotnosti (Church et al. 2010). Další studie poukázaly na jeho souvislost s leptin-melanokortinovou signalizací (Rask-Andersen et al. 2011, Wang et al. 2011) nebo s regulací ghrelinu (Karra et al. 2013). Podle nových poznatků může tento gen působit jako senzor cirkulujících aminokyselin (Gulati et al. 2013) a podílet se spíše na vývojových fázích organismu než na modulaci tělesné hmotnosti (Boissel et al. 2009, Fischer et al. 2009). Zvažována je tedy hypotéza, že intronové polymorfismy asociované s obezitou mohou ovlivňovat a regulovat tělesnou hmotnost prostřednictvím jiných genů než samotným *FTO* – např. genem *RPGRIP1L* kolem 100 bp (Stratigopoulos et al. 2014), či *IRX3* vzdáleným až 500 kb od *FTO* (Smemo et al. 2014).

Efekt variant genu *FTO* na BMI dosud zůstává největší ze všech genů objevených díky strategii GWAS (Tabulka 1). Původní asociace s obezitou byla nalezena pro polymorfismus rs9939609, který je lokalizován v prvním intronu genu *FTO* (Frayling et al. 2007). V této oblasti se nacházejí další polymorfismy (např. rs1421085, rs17817449), které jsou ve vzájemné silné vazebné nerovnováze ($r^2 > 0,8$) a jsou rovněž popisované ve vztahu k obezitě (Dina et al. 2007, Speliotes et al. 2010). Rizikové homozygoté varianty rs9939609 genu *FTO* mají 1,67krát vyšší riziko obezity a tělesnou hmotnost o 3 kg vyšší oproti nenosičům rizikové alely (Frayling et al. 2007). Efekt variant genu *FTO* začíná být patrný od tří let, během dospívání sílí a od dvaceti let opět postupně klesá (Hardy et al. 2010, Rzehak et al. 2010).

Produkt genu ***MC4R*** (**melanocortin 4 receptor**) patří do rodiny 7transmembránových receptorů spřažených s G-proteinem. Gen je lokalizován na 18. chromozomu (18q22) a silně exprimován v mozku, kde je zapojen do regulace energetické homeostázi, viz kapitola 2.2.1.

Výzkum například ukázal, že myš s knockoutovaným genem *MC4R* neodpovídala na anorexigenní stimulaci α -MSH (Marsh et al. 1999), byla obézní s přidruženou hyperfágií, hyperinzulinémií a hyperglykémii (Huszar et al. 1997). Obdobný fenotyp byl nalezen i u lidí s mutacemi v *MC4R* (Farooqi et al. 2003).

První polymorfismy asociované s BMI byly objeveny ještě před érou GWAS. Kódující varianty p.Val103Ile a p.Ile251Leu jsou popsány jako protektivní vůči obezitě (Geller et al. 2004, Stutzmann et al. 2007). Polymorfismus rs17782313 byl druhým významným výsledkem GWAS – jeho asociace s rostoucím BMI byla potvrzena i na souboru 5 988 dětí, přičemž riziko obezity bylo 1,30 (Loos et al. 2008). Další varianty rs17700633 a rs12970134 byly asociovány s BMI u dánské populace (Zobel et al. 2009). Vzhledem k intergenní lokalizaci těchto SNPs (například rs17782313 leží 188 kb od kódující oblasti genu *MC4R*), je ale třeba prokázat, zda a jak tyto varianty regulují expresi *MC4R* (Loos et al. 2008).

***PCSK1* (proprotein convertase subtilisin/kexin type 1)** leží na 5. chromozomu (5q15-q21) a produkuje konvertázu prohormonu 1/3 (PC1/3) patřící do rodiny endoproteáz, která specificky zpracovává prohormony a neuropeptidové prekurzory. Podílí se například na konverzi proinzulinu na inzulin či sestřihu anorexigenního neuropeptidu POMC (Jansen et al. 1995). PC1/3 deficiencie způsobená mutací v genu *PCSK1* vedla k obezitě, hyperproinzulinémií a hypogonadotropnímu hypogonadismu (Jackson et al. 1997). U myši s knockoutovaným genem *PCSK1* se obezita překvapivě neobjevila (Zhu et al. 2002). Myší model obezity byl vytvořen až prostřednictvím mutace p.Asn222Asp (Lloyd et al. 2006). Této mutaci sousedí běžný polymorfismus rs6232 (p.Asn221Asp), který společně s další variantou rs6234-rs6235 (p.Gln665Glu-p.Ser690Thr) zvyšuje riziko obezity v populaci (Benzinou et al. 2008, Nead et al. 2015). Funkční analýza rs6232 potvrdila sníženou proteolytickou aktivitu konvertázy, zatímco u rs6234-rs6235 ke změnám aktivity oproti wild-type nedošlo (Benzinou et al. 2008).

Produktem genu ***BDNF* (brain-derived neurotrophic factor)** lokalizovaného na 11. chromozomu (11p13) je nervový růstový faktor, který je produkován kortikálními neurony v mozku a hraje klíčovou roli pro přežívání neuronů striata (Zuccato et al. 2001). Narušená exprese genu *BDNF* je asociována s neurodegenerativními i psychickými chorobami (Satomura et al. 2011, Zuccato et al. 2001). *BDNF* je silně exprimován v hypotalamu a společně se svým tyrosin kinázovým receptorem (TrkB) je mimo jiné součástí regulace

energetického příjmu prostřednictvím melanokortinové signalizační kaskády (Xu et al. 2003), viz kapitola 2.2.1. Na myším modelu vedla delece genu *BDNF* k hyperfágii a obezitě (Unger et al. 2007). Gen *BDNF* se také řadí mezi kauzální geny pro monogenní obezitu (Gray et al. 2006). GWAS v roce 2009 detekovaly dva polymorfismy asociované s obezitou – rs4923461 a rs925946 (Thorleifsson et al. 2009).

***TMEM18* (transmembrane protein 18)** se nachází na 2. chromozomu (2p25.3) a kóduje jaderný transmembránový protein, který se pravděpodobně podílí na buněčné migraci (Jurvansuu et al. 2008). Podle další studie tento protein specificky váže DNA a tlumí transkripci (Jurvansuu & Goldman 2011). *TMEM18* je exprimován ve většině lidských tkání včetně mozku, nicméně jeho role v patogenezi obezity nebyla dosud vysvětlena. Pokusy u myši s různým jídelním a hmotnostním profilem neukázaly změny v expresi *TMEM18* v hypotalamu (Almén et al. 2010).

***SH2B1* (Src-homology-2 /SH2/ domain containing putative adaptor protein 1)** je lokalizovaný na 16. chromozomu (16p11.2), jedná se o gen kódující adaptorový signalizační protein obsahující doménu SH2, kterou se váže na různé tyrosinové kinázy. Podílí se tak významně na regulaci energetické bilance prostřednictvím signalizace leptinu a inzulínu (Li et al. 2007, Riedel et al. 1997). Delece genu *SH2B1* vedla u myši k leptinové a inzulínové rezistenci, hyperfágii a obezitě (Ren et al. 2007).

***KCTD15* (potassium channel tetramerization domain containing 15)** umístěný na 19. chromozomu (19q13.11) je gen se stále nejasnou funkcí. Dosud byla popsána jeho role v embryonálním vývoji neurální lišty prostřednictvím inhibice transkripčního faktoru AP-2 α (Zarelli & Dawid 2013). Ten se mimo jiné podílí na regulaci diferenciaci adipocytů (Holt & Lane 2001) a může tak být biologickým pojítkem mezi genem *KCTD15* a obezitou.

***SEC16B* (SEC16 homolog B, endoplasmic reticulum export factor)** leží na 1. chromozomu (1q25.2). Jeho produktem je savčí homolog kvasinkového Sec16 (*Saccharomyces cerevisiae*), který je umístěn na membránu endoplazmatického retikula, kde se účastní transportu proteinů (Bhattacharyya & Glick 2007).

Polymorfismy výše uvedených genů *TMEM18*, *SH2B1*, *KCTD15* a *SEC16B* byly objeveny v roce 2009 (Thorleifsson et al. 2009, Willer et al. 2009). Jedinou missense variantou je rs7498665 (p.Thr484Ala) genu *SH2B1*, ostatní polymorfismy jsou umístěné mezi

geny. Rs7561317 je lokalizovaný 22 kb distálně od *TMEM18* a jeho efekt na BMI byl hned po *FTO* nejsilnější ze všech identifikovaných variant (Thorleifsson et al. 2009).

2.3.4 Vztah polymorfismů kandidátních genů k fenotypovým charakteristikám

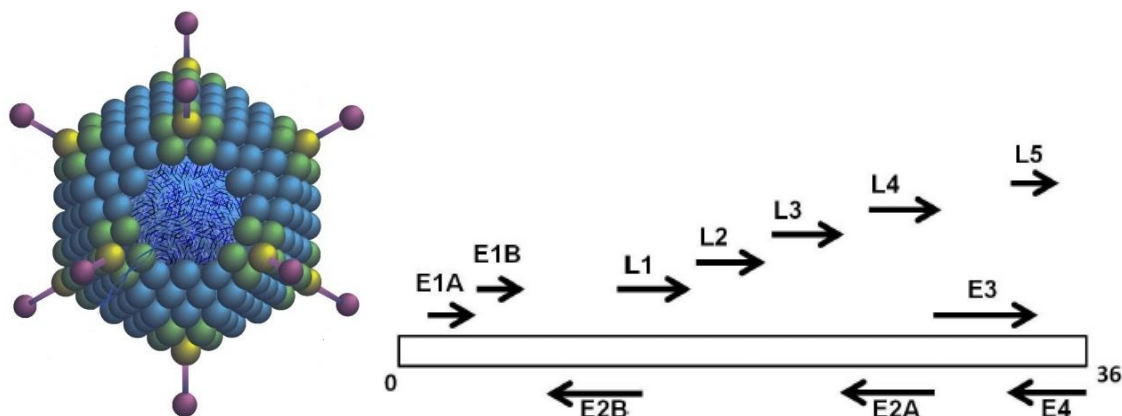
Nejasná úloha většiny polymorfismů kandidátních genů v patogenezi obezity vede ke zkoumání dalších parametrů, které s obezitou úzce souvisejí a mohou tak pomoci odhalit oblast působení daného genu. Asociační studie sledovaly kromě vlivu genových variant na BMI také jejich vliv na další tělesné charakteristiky. Rizikové alely rs925946 *BDNF*, rs7561317 *TMEM18* a rs9939609 *FTO* byly asociované s vyšším obvodem pasu (Frayling et al. 2007, Sandholt et al. 2011). *TMEM18* a *FTO* mohou ovlivňovat množství tělesného tuku, *SH2B1* spíše množství netukové tkáně (Renström et al. 2009). Nicméně řada studií vliv rizikových alel na obvod pasu či množství a ukládání tělesného tuku nepotvrdila, případně nalezené závislosti po adjustaci na BMI vymizely (Bauer et al. 2009, Haupt et al. 2010).

Jednotlivé alely kandidátních genů pro obezitu byly dále zkoumány ve vztahu k biochemickým parametrům, metabolickému syndromu nebo T2DM. Mezi nejsledovanější patří rs9939609 genu *FTO*, nicméně výsledky nepřinesly jednoznačné závěry. Riziková alela A tohoto polymorfismu byla asociovaná s vyššími hladinami inzulínu, glukózy, triacylglycerolů a nižší hladinou lipoproteinu o vysoké denzitě (HDL) (Freathy et al. 2008). Ovšem na souboru německých dětí a adolescentů se asociace s biochemickými parametry nepotvrdila (Müller et al. 2008). V jiné studii se asociace našla pouze s hladinou glukózy (Liem et al. 2009). Riziko metabolického syndromu zvyšuje nosičství obezitogenní alely rs9939609 genu *FTO* (Wang et al. 2012, Zhou et al. 2012). Ve srovnání s *FTO* byly ostatní geny v souvislosti s metabolickými změnami studovány mnohem méně. Riziková alela rs7498665 genu *SH2B1* byla asociovaná s vyšší hladinou sérového leptinu u dospělých dvojčat. Tento polymorfismus by se tak mohl podílet na rozvoji obezity zapojením do leptinové signalizace (Jamshidi et al. 2007). Polymorfismy genu *PCSK1* jsou dávány do souvislosti především s glukózovým metabolismem (Gjesing et al. 2011, Heni et al. 2010). Se zvýšeným rizikem T2DM byl dále asociován rs7498665 genu *SH2B1*. Naopak polymorfismus rs4923461 *BDNF* má vůči T2DM vliv protektivní (Sandholt et al. 2011), a to i po adjustaci na BMI. Diabetogenní efekt genových variant *FTO* a *MC4R* je pravděpodobně dán jejich vlivem na BMI (Freathy et al. 2008, Zobel et al. 2009).

Vzhledem k multifaktoriálnímu charakteru obezity se zkoumá i potenciální vliv genových variant na behaviorální faktory, především na jídelní zvyklosti či pohybovou aktivitu. I v tomto směru nejvíce prozkoumán gen *FTO*. Polymorfismy tohoto genu nejsou asociovány s energetickým výdejem a fyzickou aktivitou (Berentzen et al. 2008, Speakman et al. 2008), nicméně u fyzicky aktivních jedinců je zeslaben efekt rizikových alel *FTO* na BMI (Kilpeläinen et al. 2011a). Naopak mnoho studií našlo asociace variant genu *FTO* s vyšším energetickým příjmem a jídelními chováními (Cecil et al. 2008, Speakman et al. 2008, Timpson et al. 2008). Dvě nedávné studie pracující s rozsáhlými soubory jedinců (177 330 dospělých, 16 094 dětí) potvrdily asociaci genu *FTO* s celkovým energetickým příjmem a příjmem proteinů (Qi et al. 2014, 2015). I u dalších variant genů se na základě dostupných informací, zejména kvůli jejich vysoké expresi v hypotalamu, předpokládá vliv na jídelní příjem. Švédská populační studie ukázala interakci mezi rs4923461 genu *BDNF* a příjmem proteinů ve vztahu k BMI (Rukh et al. 2013). Varianty genů *SH2B1*, *KCTD15* a *BDNF* byly rovněž asociovány s příjmem jednotlivých nutrientů (Bauer et al. 2009; McCaffery et al. 2012). Doposud však bylo publikováno pouze několik prací věnujících se této problematice.

2.4 Lidský adenovirus 36

Adenoviry jsou neobalené středně velké viry s ikosahedrální proteinovou kapsidou. Genom se skládá z lineární dvouřetězcové molekuly DNA s kovalentně navázanými terminálními proteiny na obou 5' koncích a časných a pozdních transkripčních jednotek, zajišťujících replikaci a translaci kapsidových proteinů (Obrázek 5).



Obrázek 5. Struktura adenoviru a organizace genomu Adv36 s časnými (E) a pozdními (L) proteiny (převzato z Al-Allaf et al. 2010; Ponterio and Gnessi 2015)

Inokulace viru Adv36 experimentálními zvířaty (kuře, myš, opice) u nich způsobila zmnožení tukové tkáně (Dhurandhar et al. 2000, 2002). Výzkum ukázal, že infekce Adv36 stimuluje diferenciaci a proliferaci preadipocytů a akumulaci lipidů v tukových buňkách myších i lidských buněčných linií (Pasarica et al. 2008, Vangipuram et al. 2004). Následně bylo zjištěno, že je infekce Adv36 asociovaná s obezitou také u lidí (Atkinson et al. 2005). V této americké studii byla prevalence positivity u obézních jedinců významně vyšší (30 %) než u neobézních (11 %). Vyšší výskyt protilátek proti Adv36 byl nalezen také u obézních dospělých z Itálie (Trovato et al. 2009), Švédska (Almgren et al. 2012), Turecka (Karamese et al. 2015) nebo Mexika (Lin et al. 2013). V belgické studii se asociace Adv36 s obezitou nepotvrdila (Goossens et al. 2009). Adv36 pozitivita zvyšuje riziko obezity rovněž u dětí, jak ukázaly studie z Koreje (Atkinson et al. 2010, Na et al. 2010), USA (Gabbert et al. 2010), Švédska (Almgren et al. 2012) či Turecka (Karamese et al. 2015) s prevalencí 22–30 % u obézních a 6–20 % u neobézních dětí.

U zvířat přítomnost infekce kromě obezity vedla paradoxně také ke snížení hladin cholesterolu, triacylglycerolů a zvýšené inzulínové senzitivě (Dhurandhar et al. 2000, Pasarica et al. 2006). Zvířecí a in vitro studie naznačují možné mechanismy účinku Adv36 v lidském organismu. Adv36 zvyšuje buněčné vstřebávání glukózy nezávisle na inzulínu prostřednictvím svého proteinu E4orf1 (Dhurandhar et al. 2011, Wang et al. 2008). Efekt Adv36 tedy nemusí být pouze obezitogenní, ale překvapivě také anti-hyperglykemický a tudíž potenciálně využitelný v léčbě diabetu. Adv36 dále inhiboval expresi genu *LEP* v tukových buňkách. Snížená hladina leptinu prostřednictvím Adv36 tak může vést k akumulaci lipidů a

vyššímu energetickému příjmu (Vangipuram et al. 2006). U lidí asociace protilátek proti Adv36 s metabolickými parametry nebyly jednoznačně popsány (Almgren et al. 2012, Na et al. 2012, Trovato et al. 2009). Ve studii Lin et al. byla Adv36 pozitivita asociována a nižšími hladinami inzulinu především u žen, u mužů naopak se zvýšenou akumulací tuku (Lin et al. 2013).

Kromě možného protektivního vlivu Adv36 na glukózový metabolismus byla zkoumána i jeho role v redukci tělesné hmotnosti. Dosud bylo provedeno pouze několik studií zaměřených na hodnocení úspěšnosti redukčních intervenčních programů s ohledem na Adv36. Podle studie 73 adolescentů Adv36 pozitivita mírně snižuje úspěšnost 4týdenního redukčního programu (Vander Wal et al. 2013), roční intervenční studie 62 obézních dospělých naopak ukázala vyšší hmotnostní úbytky u Adv36 pozitivních jedinců (Trovato et al. 2012).

Vliv genetických faktorů na náchylnost k různým typům infekcí byl dokumentován dvojčecími a adoptivními studiemi. Éra GWAS zasáhla i výzkum infekčních onemocnění a byly tak objeveny desítky genových lokusů asociovaných s infekčními chorobami, jako jsou tuberkulóza, lepra, hepatitidy a další (Chapman & Hill 2012). Potenciální vztah polymorfismů kandidátních genů pro obezitu a infekce Adv36 dosud nebyl zkoumán. Úloha infekce v patogenezi obezity vede rovněž k hypotéze, zda náchylnost k infekci Adv36, případně rozvoj obezity po prodělané infekci nejsou geneticky predisponovány.

3 Soubor a shrnutí metodiky

Předkládané dílčí studie, které jsou součástí dizertační práce, byly realizovány na souboru českých adolescentů z projektu Childhood Obesity Prevalence and Treatment (COPAT). Projekt Endokrinologického ústavu COPAT probíhal po celém území České republiky a zabýval se problematikou obezity a jejích zdravotních komplikací, včetně metabolického syndromu u dětí ve věku 13–18 let. V rámci epidemiologické části byl vyšetřen reprezentativní vzorek 1 533 adolescentů. Do intervenční části projektu bylo zařazeno 562 jedinců s nadváhou a obezitou, kteří absolvovali 4týdenní redukční program ve specializovaných pracovištích pro léčbu dětské obezity. Na projekt navázaly další studie, které umožnily rozšíření sledovaného spektra genetických, hormonálních a tělesných parametrů, ale také zaměření se na další faktory, například jídelní či infekční.

Výjimečnost souboru, na kterém byla dizertační práce zpracována, spočívá především v jeho četnosti a velmi podrobné fenotypové charakterizaci. U všech jedinců byly k dispozici následující parametry: **anamnestické** – porodní hmotnost a délka, perinatální komplikace, délka kojení, závažná onemocnění, medikace, délka spánku, věk manifestace obezity, informace o tělesné výšce a hmotnosti provedených v rámci dvouletých preventivních prohlídek, kardiometabolická onemocnění u účastníka studie, jeho rodičů a prarodičů (hypertenze, dyslipidémie apod.); **Klinické** – krevní tlak a pulz; **Antropometrické** – tělesná hmotnost, tělesná výška, obvody (pas, břicho, boky, paže), kožní řasy (nad bicepsem, nad tricepsem, pod lopatkou, na břicho, na boku), indexy (BMI, WHR); **Vyšetření tělesného složení** – elektrická bioimpedance přístroji Tanita BC-418 MA a Tanita Viscan AB140 (Tanita Corporation, Tokyo, Japonsko); **Behaviorální** – dotazníky jídelního chování „Eating Inventory“, a dotazník fyzické aktivity „Physical Activity Questionnaire“; **Energetický příjem** – vyhodnocení 3denního jídelníčku programem NutriMaster (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA), dotazník jídelní frekvence; **Biochemické** – nalačno lipidový profil, glykémie, C-reaktivní protein, alaninaminotransferáza, aspartataminotransferáza, glutamyltranspeptidáza; **Hormonální** – inzulin, C-peptid, glukagon, tyreostimulační hormon, estradiol, testosteron, leptin, adiponektin, obestatin, ghrelin, inkretiny a další (analyzátory Cobas 6000 c501 a e601, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo; Bio-Plex, Bio-

Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Součástí vyšetření byl informovaný souhlas, schválený etickou komisí Endokrinologického ústavu v Praze.

Genetické vyšetření bylo provedeno pomocí následujících metod: Izolace DNA: z periferní krve kitem QuickGene DNA whole blood kit (Fujifilm, Tokyo, Japonsko) na přístroji QuickGene 610L (Fujifilm, Tokyo, Japonsko). Genotypizace: 11 SNPs, které byly vybrány na základě GWAS – rs7561317 (*TMEM18*), rs7498665 (*SH2B1*), rs29941, (*KCTD15*), rs6232 a rs6235 (*PCSK1*), rs925946 a rs4923461 (*BDNF*), rs10913469 (*SEC16B*), rs12970134 a rs17782313 (*MC4R*), rs9939609 (*FTO*) bylo analyzováno metodou alelické diskriminace ve formátu TaqMan sond (TaqMan SNP Genotyping Assays, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Rs12970134, rs17782313, rs9939609 byly analyzovány na přístroji Real-Time PCR LightCycler 480 (Roche, Basilej, Švýcarsko), ostatní SNPs na Biomark (Fluidigm, South San Francisco, CA, USA) ve spolupráci s Laboratoří genové exprese, Biotechnologického ústavu AV ČR.

Adv36 pozitivita byla stanovena prostřednictvím sérologické detekce protilátek metodou kompetitivní Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA), vyvinutou a provedenou spolupracujícím pracovištěm Obetech Obesity Research Center (Richmond, VA, USA) pod vedením profesora R. Atkinsona. Na základě výše titru protilátek proti Adv36 tak byli vyšetřovaní adolescenti rozděleni na Adv36 pozitivní, resp. Adv36 negativní jedince.

Statistická analýza získaných dat, které byly průběžně ukládány do elektronické databáze Microsoft Office Access 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) byla provedena pomocí programů NCSS 2004 (NCSS, LLC, Kaysville, UT, USA), Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) a Statgraphics Centurion, version XV (Statpoint Technologies, Warrenton, VA, USA). Použité metody zahrnovaly neparametrické testy (Mann-Whitneyův test, Kruskal-Wallisův test), chí-kvadrát, odds ratio, lineární regresní analýzu a další.

4 Publikace

Výsledky dizertační práce shrnuje osm publikací. Předkládané původní práce se věnují jednotlivým rizikovým faktorům u souboru české dospívající populace. Polymorfismy kandidátních genů byly zkoumány nejen ve vztahu k nadváze a obezitě, ale také k podvázce, k jednotlivým antropometrickým a biochemickým parametrům a k metabolickému syndromu (**kapitola 4.1**). Z pohledu zdravotních komplikací plynoucích z obezity, byla rovněž zjišťována prevalence inzulinové rezistence a T2DM (**kapitola 4.2**). Otázku, zda vybrané polymorfismy ovlivňují také energetický příjem a výběr jednotlivých nutrientů si kladla další studie (**kapitola 4.3**). Druhému zkoumanému rizikovému faktoru obezity – infekci Adv36 – se věnovaly dvě práce. Nejprve byl u české dospívající populace ověřován samotný vztah Adv36 k tělesné hmotnosti a kardiometabolickým charakteristikám (**kapitola 4.4**). V následujícím krátkém sdělení bylo řešeno možné ovlivnění úspěšnosti redukčního programu u podskupiny obézních dívek přítomností protilátek proti Adv36 (**kapitola 4.5**). Potenciální vztah mezi polymorfismy kandidátních genů a infekcí Adv36 u sledovaného souboru analyzovala další studie (**kapitola 4.6**). Dizertační práci doplňují dvě přehledové studie zabývající se dosavadními poznatky o prvním objeveném kandidátním genu pro obezitu na základě GWAS – *FTO* (**kapitola 4.7**) a celkovým výzkumem genetického pozadí běžných forem obezity (**kapitola 4.8**).

4.1 Asociace polymorfismů kandidátních genů pro obezitu s metabolickým syndromem a přidruženými parametry u 1 443 českých adolescentů

Autoři: Dušátková L., Zamrazilová H., Sedláčková B., Včelák J., Hlavatý P., Aldhoon-Hainerová I., Korenková V., Bradnová O., Bendlová B., Kunešová M., Hainer V.

Folia Biologica (Praha) 2013; 59(3):123–133. IF = 1,000

Abstrakt: GWAS odhalily desítky genových variant asociovaných s obezitou, ale jen málo studií zkoumalo jejich asociaci s metabolickým syndromem. V této práci byla provedena genotypizace 11 variant genů *TMEM18*, *SH2B1*, *KCTD15*, *PCSK1*, *BDNF*, *SEC16B*, *MC4R* a *FTO* u 1 443 adolescentů a byla zkoumána jejich asociace s obezitou, metabolickým syndromem a přidruženými parametry. Výsledky potvrdily asociaci polymorfismu rs9939609

genu *FTO* s nadváhou a obezitou (OR 1,40; 95% CI 1,21–1,63; $p < 0,001$) a minoritní alely rs7561317 genu *TMEM18* s podváhou (OR 1,78; 95% CI 1,14–2,79; $p = 0,015$). Rizikové alely rs925946 *BDNF* a rs17782313 *MC4R* zvyšovaly riziko přítomnosti metabolického syndromu (OR 1,53; 95% CI 1,14–2,04; $p = 0,005$; 1,51; 95% CI 1,12–2,04; $p = 0,009$). Rs6235 genu *PCSK1* negativně korelovala se zvýšenou hladinou krevní glukózy (OR 0,69; 95% CI 0,49–0,97; $p = 0,040$). V této práci byla u souboru českých adolescentů potvrzena jak asociace polymorfismů *FTO*, *MC4R* a *BDNF* s nadváhou a obezitou, resp. s metabolickým syndromem, tak protektivní role *PCSK1* v rozvoji T2DM.

U této práce jsem se podílela na sběru a analýze dat, vyhodnocování výsledků a sepsání manuskriptu.

Original Article

Association of Obesity Susceptibility Gene Variants with Metabolic Syndrome and Related Traits in 1,443 Czech Adolescents

(single-nucleotide polymorphism / *FTO* gene / obesity, metabolic syndrome / adolescence)

L. DUŠÁTKOVÁ^{1,2}, H. ZAMRAZILOVÁ¹, B. SEDLÁČKOVÁ^{1,3}, J. VČELÁK⁴,
P. HLAVATÝ¹, I. ALDHOON HAINEROVÁ^{1,5}, V. KORENKOVÁ⁶, O. BRADNOVÁ^{4,7},
B. BENDLOVÁ⁴, M. KUNEŠOVÁ¹, V. HAINER¹

Institute of Endocrinology, ¹Obesity Management Centre, ⁴Department of Molecular Endocrinology, Prague, Czech Republic

Faculty of Science, Charles University in Prague, ²Department of Genetics and Microbiology,

³Department of Biochemistry, ⁷Department of Anthropology and Human Genetics, Prague, Czech Republic

⁵Department of Paediatrics and Centre for Research of Diabetes, Metabolism and Nutrition, Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic

⁶Laboratory of Gene Expression, Institute of Biotechnology AS CR, v. v. i., Prague, Czech Republic

Abstract. Genome-wide association studies have revealed several gene variants associated with obesity; however, only a few studies have further investigated their association with metabolic syndrome. We performed a study of eleven variants in/near genes *TMEM18*, *SH2B1*, *KCTD15*, *PCSK1*, *BDNF*, *SEC16B*, *MC4R*, and *FTO* in Czech adolescents and analysed their association with obesity, metabolic syndrome

and related traits. Genotyping was performed in 1,443 adolescents aged 13.0–17.9 years. Anthropometric parameters, biochemical parameters and blood pressure were assessed. Metabolic syndrome was defined according to the International Diabetes Federation. The *FTO* rs9939609 variant was associated with overweight/obesity (OR 1.40, 95% CI 1.21–1.63, $P < 0.001$). The minor allele of *TMEM18* rs7561317 was related to underweight (OR 1.78, 95% CI 1.14–2.79, $P = 0.015$). *BDNF* rs925946 and *MC4R* rs17782313 were associated with metabolic syndrome (OR 1.53, 95% CI 1.14–2.04, $P = 0.005$; 1.51, 95% CI 1.12–2.04, $P = 0.009$). The *PCSK1* rs6235 variant was negatively related to increased blood glucose (OR 0.69, 95% CI 0.49–0.97, $P = 0.040$). In conclusion, the *FTO* variant was associated with overweight/obesity in Czech adolescents. Moreover, *MC4R* and *BDNF* variants increased the risk of metabolic syndrome, probably through their effect on abdominal obesity. The *PCSK1* variant may have a protective role in the development of type 2 diabetes.

Received January 16, 2013. Accepted February 26, 2013.

This study was supported by GAUK 370911 of the Charles University Grant Agency, NT/13792 of the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic, 7F08077 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, grant of the Danone Institute and CZ0123 from Norway through the Norwegian Financial Mechanisms.

Corresponding author: Lenka Dušátková, Obesity Management Centre, Institute of Endocrinology, Národní 8, 116 94 Prague 1, Czech Republic. Phone: (+420) 723 519 898; Fax: (+420) 224 905 325; e-mail: ldustatkova@gmail.com

Abbreviations: BDNF – brain-derived neurotrophic factor, BMI – body mass index, CI – confidence intervals, COPAT – Childhood Obesity Prevalence And Treatment, FTO – fat mass and obesity associated, GWAS – genome-wide association studies, HDL – high-density lipoprotein, IDF – International Diabetes Federation, KCTD15 – potassium channel tetramerization domain containing 15, LDL – low-density lipoprotein, MC4R – melanocortin 4 receptor, MS – metabolic syndrome, OR – odds ratio, PCSK1 – proprotein convertase subtilisin/kexin type 1, SDS – standard deviation score, SEC16B – SEC16 homologue B, SH2B1 – SH2B adaptor protein 1, SNP – single-nucleotide polymorphism, TMEM18 – transmembrane protein 18.

Introduction

The prevalence of obesity has been increasing worldwide in children and adolescents (Lobstein et al., 2004). This trend is alarming because obesity in childhood tends to persist to adulthood with a high incidence of cardiometabolic complications (Katzmarzyk et al., 2001). Metabolic syndrome (MS) is a cluster of risk factors for cardiometabolic diseases that includes abdominal obesity, dyslipidaemia, impaired glucose metabolism and hypertension (Zimmet et al., 2007). Due to the

current obesity epidemic, MS is often diagnosed already in children and adolescents (Bokor et al., 2008).

Genome-wide association studies (GWAS) have identified several loci associated with body mass index (BMI) and obesity. In 2007, a variant of the fat mass and obesity associated gene (*FTO*) demonstrating a strong association with BMI was discovered and until now has been considered as one of the most studied genes related to obesity (Frayling et al., 2007). The following year, single-nucleotide polymorphisms (SNPs) near the melanocortin 4 receptor gene (*MC4R*) (Loos et al., 2008) and the proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 gene (*PCSK1*) were designated as candidate genes for obesity (Benzinou et al., 2008). Thanks to extensive GWAS, 10 other obesity susceptibility loci were identified, e.g. transmembrane protein 18 (*TMEM18*), SH2B adaptor protein 1 (*SH2B1*), potassium channel tetramerization domain containing 15 (*KCTD15*), brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*), and SEC16 homologue B (*SEC16B*) (Thorleifsson et al., 2009; Willer et al., 2009). The last GWAS focusing on BMI associations confirmed 14 previously reported loci and revealed 18 new loci (Speliotes et al., 2010). Most of the mentioned SNPs have been replicated in children and adolescents with a similar effect on BMI (Zhao et al., 2009; den Hoed et al., 2010). Confirmation and extension of findings from GWAS in selected population represents the next step of further investigations.

The aim of the present study was to explore the association of 11 previously reported variants in/near genes *TMEM18*, *SH2B1*, *KCTD15*, *PCSK1*, *BDNF*, *SEC16B*, *MC4R* and *FTO* with different body weight statuses (underweight, normal weight, overweight, obesity), abdominal obesity, MS and related traits in Czech adolescents.

Material and Methods

Subjects

The total of 1,443 adolescents (661 boys, 782 girls) aged 13.0–17.9 years were recruited from the Czech Childhood Obesity Prevalence And Treatment (COPAT) project, focused on risk factors for obesity and MS in the adolescence. The COPAT project was conducted in different regions across the Czech Republic and included a representative cohort (N = 1,533) established by the stratified random selection and overweight/obese adolescents (N = 562) that had undergone a 4-week weight management programme in specialized clinical settings.

The present study included participants from both cohorts: 60 underweight, 713 normal weight, 194 overweight and 476 obese adolescents characterized in Table 1. Underweight, normal weight, overweight and obesity were defined by BMI percentiles according to the Czech national reference data (Kobzova et al., 2004): $\leq 10^{\text{th}}$, $10^{\text{th}}-90^{\text{th}}$, $90^{\text{th}}-97^{\text{th}}$, $\geq 97^{\text{th}}$, respectively. The standard deviation scores (SDS) of anthropometric parameters were assessed according to the national reference data (Kobzova et al., 2004). The reference percentiles of German adolescent population were used for the waist circumference (Haas et al., 2011). MS was defined according to the International Diabetes Federation (IDF) criteria for children and adolescents (Zimmet et al., 2007).

The study was approved by the Ethics Committee of the Institute of Endocrinology and was performed in accordance with the Helsinki Declaration. All participants and their parent(s) provided written informed consent.

Anthropometric and biochemical characteristics

Body height was measured by a stadiometer (precision 0.1 cm); body weight was measured by Tanita

Table 1. Characteristics of the studied cohort

| Variable | Underweight | Normal weight | Overweight | Obese |
|---------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Number | 60 | 713 | 194 | 476 |
| Boys/girls | 23/37 | 337/376 | 85/109 | 216/260 |
| Age (years) | 16.4 (15.5–17.1) | 16.0 (15.1–16.9) | 15.8 (14.6–17) | 15.4 (14.2–16.6) |
| Height-SDS | -0.3 (-0.9–0.3) | -0.1 (-0.7–0.6) | 0.0 (-0.5–0.8) | 0.2 (-0.6–0.8) |
| Weight-SDS | -1.4 (-1.7–1.0) | -0.1 (-0.6–0.5) | 1.5 (1.1–1.9) | 3.2 (2.4–4.4) |
| BMI-SDS | -1.4 (-1.6–1.2) | 0.0 (-0.5–0.5) | 1.5 (1.3–1.8) | 3.3 (2.6–4.6) |
| Waist circumference-SDS | -1.3 (-1.6–1.0) | -0.4 (-0.8–0) | 0.7 (0.4–1.2) | 2.3 (1.5–3.1) |
| Abdominal circumference-SDS | -0.5 (-1–0.2) | 0.4 (-0.1–1) | 2.3 (1.6–2.8) | 4.3 (3.3–5.4) |
| Hip circumference-SDS | -1.2 (-1.4–0.7) | 0.0 (-0.5–0.6) | 1.4 (1.1–1.9) | 2.8 (2.1–3.7) |
| Arm circumference-SDS | -1.3 (-1.7–0.9) | 0.1 (-0.3–0.7) | 1.7 (1.2–2.2) | 3.1 (2.4–3.9) |
| Total body fat (%) | 15.2 (12.4–18.5) | 20.1 (15.1–24.4) | 29.3 (23.1–32.1) | 35.4 (30.6–40) |
| Trunk fat (%) | 11 (8.1–13) | 15.2 (11.3–19.5) | 23.8 (19.4–27.3) | 30.4 (25.8–35.9) |
| Systolic blood pressure (mmHg) | 114 (105–124) | 121 (111–128) | 120 (111–128) | 122 (113–131) |
| Diastolic blood pressure (mmHg) | 76 (69–81) | 77 (72–83) | 76 (72–82) | 78 (73–84) |
| Glucose (mmol/l) | 5.0 (4.7–5.4) | 5.0 (4.7–5.2) | 5.0 (4.7–5.3) | 5.0 (4.7–5.3) |
| C-peptide (mmol/l) | 0.7 (0.6–0.8) | 0.7 (0.6–0.8) | 0.8 (0.7–0.9) | 0.9 (0.7–1.2) |
| Insulin (mmol/l) | 9.2 (6.4–12.8) | 9.7 (7.3–12.8) | 11.8 (8.8–15.4) | 14.7 (10.7–21.5) |
| Triglycerides (mmol/l) | 0.7 (0.6–1.0) | 0.8 (0.6–1.1) | 0.9 (0.7–1.1) | 1.1 (0.8–1.6) |
| HDL-cholesterol (mmol/l) | 1.5 (1.2–1.7) | 1.4 (1.2–1.6) | 1.3 (1.1–1.5) | 1.2 (1–1.4) |
| Total cholesterol (mmol/l) | 4.3 (3.7–4.6) | 4.0 (3.6–4.6) | 4.1 (3.7–4.7) | 4.3 (3.7–4.9) |
| LDL-cholesterol (mmol/l) | 2.1 (1.7–2.5) | 2.1 (1.7–2.6) | 2.3 (1.9–2.8) | 2.4 (2.0–3.0) |

Data are expressed as a median (lower–upper quartile).

BC-418 MA (Tanita Corporation, Tokyo, Japan; precision 0.1 kg). Body circumferences were determined by a tape measure (precision 0.1 cm) in a horizontal level; waist circumference midway between the upper iliac crest and the lower rib, abdominal circumference at the level of umbilicus, hip circumference over the maximum buttocks diameter, arm circumference in the middle of relaxed arm. The percentage of total body and trunk fat was measured by bioelectric impedance Tanita BC-418 MA and Tanita AB-140 ViScan (Tanita Corporation, Tokyo, Japan). We previously demonstrated that trunk fat determined by bioelectric impedance in Czech adolescents highly correlated with both dual-energy X-ray absorptiometry and magnetic resonance imaging measurements (Zamrazilova et al., 2010).

Peripheral blood samples were taken from the cubital vein after an overnight fast. Glucose, insulin, C-peptide, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol and triglycerides were determined using the Cobas® 6000 instrument and commercial kits (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Blood pressure was measured by the arm sphygmomanometer with appropriate cuff size. Two sets of measurements were performed and an average value was calculated.

Genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using QuickGene DNA whole blood kit (Fujifilm, Tokyo, Japan). Genotyping of SNPs: rs7561317 (*TMEM18*), rs7498665 (*SH2B1*), rs29941 (*KCTD15*), rs6232 and rs6235 (*PCSK1*), rs925946 and rs4923461 (*BDNF*), rs10913469 (*SEC16B*), rs12970134 and rs17782313 (*MC4R*), rs9939609 (*FTO*) was performed using the TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA). The assays were run in a Biomark instrument (Fluidigm, South San Francisco, CA) and rs12970134, rs17782313, and rs9939609 in a LightCycler 480 (Roche, Basel, Switzerland). To ensure consistency among runs, samples of known genotypes and negative controls were used in every run. The genotype distributions of all SNPs followed the Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.2$). The SNPs located in *PCSK1* (rs6232, rs6235) and *BDNF* (rs925946, rs4923461) were incompletely linked ($r^2 = 0.16$ and 0.11 , respectively). The SNPs near *MC4R* (rs12970134, rs17782313) were in high linkage disequilibrium ($r^2 = 0.79$).

Statistical analysis

The statistical software NCSS 2004 (NCSS LLC, Kaysville, Utah) and Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA) were used. P values (two-tailed) < 0.05 were considered statistically significant. The Hardy-Weinberg equilibrium was tested using the χ^2 test. Linkage disequilibrium was estimated using Haploview V3.2. (Barrett et al., 2005). Genotype and allele frequencies were compared by χ^2 test with Yates

correction. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CI) were calculated to determine associations of each SNP and weight status (underweight, overweight, obesity) using normal weight subjects as controls; for MS and its components, non-carriers were used as controls. Association of SNPs and quantitative traits (anthropometric, biochemical characteristics, blood pressure) were analysed by general linear models after adjustments for sex and age. Anthropometric traits were additionally adjusted for BMI. Due to the non-Gaussian distribution, data are expressed as medians with lower and upper quartiles.

Results

Associations with body weight categories

The observed genotype and allele frequencies of SNPs in the overweight/obese and underweight/normal weight adolescents are shown in Table 2. Significant differences were found for the *FTO* rs9939609 variant ($P < 0.001$) and the *SEC16B* rs10913469 variant ($P = 0.033$). The *FTO* rs9939609 A-allele was associated with overweight and/or obesity (Table 3). ORs were 1.27 (95% CI 1.01–1.59, $P = 0.046$) for overweight and 1.46 (95% CI 1.24–1.73, $P < 0.001$) for obesity. No other variants showed significant associations. In the case of *SEC16B* rs10913469 there was a tendency towards an association with overweight and obesity (OR 1.21, 95% CI 0.99–1.47, $P = 0.066$).

Associations between each SNP and underweight are demonstrated in Table 3. The *TMEM18* rs7561317 variant was found to be significantly related to underweight. The minor allele increased the risk of underweight (OR 1.78, 95% CI 1.14–2.79, $P = 0.015$).

Associations with metabolic syndrome

The prevalence of MS in our cohort of 1,443 Czech adolescents was 7.7 % (65 boys, 46 girls). MS was only present in overweight and obese adolescents in whom its prevalence reached 16.6 %. Table 3 shows associations of the 11 investigated variants with MS. The *BDNF* rs925946 T-allele ($P = 0.005$), the *MC4R* rs12970134 A-allele ($P = 0.035$), and the *MC4R* rs17782313 C-allele ($P = 0.009$) increased the risk of MS. However, the gender-specific analyses revealed that the increased risk was only significant in boys with OR of 1.77 (95% CI 1.22–2.59, $P = 0.004$ vs. girls $P = 0.412$) for *BDNF* rs925946 and OR of 1.56 (95% CI 1.05–2.33, $P = 0.036$ vs. $P = 0.156$) for *MC4R* rs17782313. The same tendency for the *MC4R* rs12970134 variant ($P = 0.069$) was also demonstrated in boys only.

A detailed case-control study was performed to determine the association of gene variants with individual risk factors of MS (carriers vs. non-carriers). Abdominal obesity was significantly related to the *FTO* variant (OR 1.39, 95% CI 1.19–1.64, $p < 0.001$). Furthermore, only in boys the minor alleles of *BDNF* rs925946 (OR 1.42, 95% CI 1.09–1.84, $p = 0.010$), *MC4R* rs12970134 (OR

Table 2. Differences of genotype and allele frequencies between overweight/obese and underweight/normal weight adolescents

| Variant | Locus | Group | Genotypes (N) | | | P ^a | RAF (%) | P ^a |
|------------|--------|-------|---------------|-----|-----|------------------|---------|------------------|
| | | | AA | AG | GG | | | |
| rs7561317 | TMEM18 | | | | | | G | |
| | | UW/NW | 14 | 208 | 551 | 0.611 | 84.7 | 0.477 |
| | | OW/OB | 13 | 165 | 492 | | 85.7 | |
| rs7498665 | SH2B1 | | AA | AG | GG | | G | |
| | | UW/NW | 249 | 388 | 136 | 0.461 | 42.7 | 0.235 |
| | | OW/OB | 234 | 329 | 106 | | 40.4 | |
| rs29941 | KCTD15 | | AA | AG | GG | | G | |
| | | UW/NW | 63 | 328 | 369 | 0.853 | 70.1 | 0.876 |
| | | OW/OB | 57 | 274 | 326 | | 70.5 | |
| rs6232 | PCSK1 | | CC | CT | TT | | C | |
| | | UW/NW | 3 | 65 | 702 | 0.143 | 4.6 | 0.098 |
| | | OW/OB | 2 | 77 | 589 | | 6.1 | |
| rs6235 | PCSK1 | | CC | CG | GG | | G | |
| | | UW/NW | 407 | 316 | 49 | 0.243 | 26.8 | 0.514 |
| | | OW/OB | 375 | 246 | 49 | | 25.7 | |
| rs925946 | BDNF | | GG | GT | TT | | T | |
| | | UW/NW | 401 | 318 | 54 | 0.520 | 27.6 | 0.831 |
| | | OW/OB | 359 | 257 | 53 | | 27.1 | |
| rs4923461 | BDNF | | AA | AG | GG | | A | |
| | | UW/NW | 468 | 263 | 40 | 0.673 | 77.8 | 0.859 |
| | | OW/OB | 415 | 215 | 39 | | 78.1 | |
| rs10913469 | SEC16B | | CC | CT | TT | | C | |
| | | UW/NW | 18 | 208 | 546 | 0.080 | 15.8 | 0.033 |
| | | OW/OB | 20 | 213 | 437 | | 18.9 | |
| rs12970134 | MC4R | | AA | AG | GG | | A | |
| | | UW/NW | 46 | 281 | 437 | 0.412 | 24.4 | 0.309 |
| | | OW/OB | 51 | 241 | 364 | | 26.1 | |
| rs17782313 | MC4R | | CC | CT | TT | | C | |
| | | UW/NW | 59 | 297 | 407 | 0.554 | 27.2 | 0.337 |
| | | OW/OB | 51 | 256 | 312 | | 28.9 | |
| rs9939609 | FTO | | AA | AT | TT | | A | |
| | | UW/NW | 139 | 387 | 240 | <0.001 | 43.4 | <0.001 |
| | | OW/OB | 176 | 338 | 152 | | 51.8 | |

^aP value was calculated by χ^2 test with Yates correction.

OW/OB – overweight/obese adolescents; UW/NW – underweight/normal weight adolescents; RAF – risk allele frequency

1.39, 95% CI 1.06–1.82, $p = 0.020$) and *MC4R* rs17782313 (OR 1.40, 95% CI 1.07–1.83, $P = 0.018$) increased the risk of abdominal obesity. Increased blood glucose was negatively associated with *PCSK1* rs6235

(OR 0.69, 95% CI 0.49–0.97, $P = 0.040$). The protective effect of this variant was only found in boys (OR 0.61, 95% CI 0.39–0.95, $P = 0.035$).

Table 3. Association of 11 SNPs with underweight, overweight and/or obesity, and metabolic syndrome

| Variant | Locus | Risk allele | RAF (%) | Underweight | | Overweight | | Obesity | | Overweight/obesity | | Metabolic syndrome | |
|------------|--------|-------------|---------|-------------------------|--------------|-------------------------|--------------|-------------------------|------------------|-------------------------|------------------|-------------------------|--------------|
| | | | | OR (95% CI) | P | OR (95% CI) | P | OR (95% CI) | P | OR (95% CI) | P | OR (95% CI) | P |
| rs7561317 | TMEM18 | G | 85 | 0.56 (0.36-0.88) | 0.015 | 1.08 (0.78-1.49) | 0.704 | 1.01 (0.80-1.27) | 0.998 | 1.03 (0.83-1.27) | 0.846 | 0.89 (0.61-1.29) | 0.611 |
| rs7498665 | SH2B1 | G | 42 | 1.23 (0.85-1.79) | 0.311 | 0.96 (0.76-1.20) | 0.754 | 0.91 (0.77-1.08) | 0.310 | 0.93 (0.80-1.08) | 0.342 | 0.99 (0.75-1.30) | 0.984 |
| rs29941 | KCTD15 | G | 71 | 0.75 (0.51-1.12) | 0.190 | 1.10 (0.86-1.42) | 0.480 | 0.95 (0.80-1.14) | 0.630 | 0.99 (0.84-1.17) | 0.969 | 0.84 (0.63-1.13) | 0.283 |
| rs6232 | PCSK1 | C | 5 | 0.89 (0.35-2.26) | 0.988 | 1.48 (0.93-2.37) | 0.128 | 1.26 (0.87-1.82) | 0.253 | 1.32 (0.95-1.85) | 0.117 | 0.57 (0.26-1.22) | 0.191 |
| rs6235 | PCSK1 | G | 27 | 0.70 (0.44-1.10) | 0.152 | 0.86 (0.67-1.12) | 0.292 | 0.94 (0.78-1.13) | 0.563 | 0.92 (0.78-1.09) | 0.349 | 0.87 (0.63-1.20) | 0.459 |
| rs925946 | BDNF | T | 28 | 0.71 (0.45-1.11) | 0.162 | 0.90 (0.70-1.16) | 0.469 | 0.98 (0.81-1.17) | 0.838 | 0.95 (0.81-1.13) | 0.618 | 1.53 (1.14-2.04) | 0.005 |
| rs4923461 | BDNF | A | 78 | 1.04 (0.66-1.63) | 0.965 | 1.09 (0.83-1.43) | 0.598 | 1.00 (0.82-1.22) | 0.970 | 1.02 (0.85-1.22) | 0.839 | 1.20 (0.85-1.70) | 0.337 |
| rs10913469 | SEC16B | C | 16 | 0.69 (0.39-1.22) | 0.245 | 1.26 (0.95-1.69) | 0.127 | 1.19 (0.96-1.47) | 0.136 | 1.21 (0.99-1.47) | 0.066 | 1.06 (0.74-1.51) | 0.819 |
| rs12970134 | MC4R | A | 24 | 1.06 (0.69-1.63) | 0.877 | 0.99 (0.76-1.29) | 0.975 | 1.15 (0.95-1.39) | 0.162 | 1.10 (0.93-1.31) | 0.295 | 1.40 (1.03-1.89) | 0.035 |
| rs17782313 | MC4R | C | 27 | 1.04 (0.69-1.59) | 0.930 | 0.97 (0.75-1.25) | 0.849 | 1.15 (0.95-1.39) | 0.157 | 1.09 (0.92-1.30) | 0.328 | 1.51 (1.12-2.04) | 0.009 |
| rs9939609 | FTO | A | 43 | 1.03 (0.71-1.50) | 0.957 | 1.27 (1.01-1.59) | 0.046 | 1.46 (1.24-1.73) | <0.001 | 1.40 (1.21-1.63) | <0.001 | 1.02 (0.77-1.34) | 0.961 |

RAF – risk allele frequency

Table 4. Association of FTO and SEC16B genotypes with anthropometric parameters

| FTO rs9939609 | AT | AA | P |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | β est ± SE | β est ± SE | |
| Weight-SDS | 0.25 ± 0.12 | 0.61 ± 0.15 | <0.001 |
| BMI-SDS | 0.28 ± 0.12 | 0.58 ± 0.15 | <0.001 |
| Waist circumference-SDS | 0.22 ± 0.10 | 0.46 ± 0.11 | <0.001 |
| Abdominal circumference-SDS | 0.02 ± 0.04 | 0.05 ± 0.05 | 0.533 ^a |
| Hip circumference-SDS | 0.33 ± 0.13 | 0.69 ± 0.16 | <0.001 |
| Arm circumference-SDS | 0.04 ± 0.05 | 0.09 ± 0.06 | 0.305 ^a |
| Total body fat (%) | 0.13 ± 0.11 | 0.47 ± 0.13 | <0.001 |
| Trunk fat (%) | -0.08 ± 0.05 | 0.02 ± 0.06 | 0.082 ^a |
| | 0.23 ± 0.11 | 0.49 ± 0.13 | <0.001 |
| | 0.01 ± 0.05 | 0.02 ± 0.06 | 0.918 ^a |
| | 1.10 ± 0.53 | 2.68 ± 0.64 | <0.001 |
| | -0.17 ± 0.24 | 0.32 ± 0.29 | 0.155 ^a |
| | 1.16 ± 0.57 | 2.89 ± 0.68 | <0.001 |
| | -0.23 ± 0.29 | 0.29 ± 0.35 | 0.237 ^a |

| SEC16B rs10913469 | CT | CC | P |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | β est ± SE | β est ± SE | |
| Weight-SDS | 0.30 ± 0.11 | 0.22 ± 0.33 | 0.033 |
| BMI-SDS | 0.31 ± 0.12 | 0.22 ± 0.33 | 0.024 |
| Abdominal circumference-SDS | 0.32 ± 0.12 | 0.27 ± 0.35 | 0.032 |
| Arm circumference-SDS | 0.03 ± 0.04 | 0.05 ± 0.12 | 0.794 ^a |
| | 0.28 ± 0.10 | 0.28 ± 0.28 | 0.018 |
| | 0.05 ± 0.04 | 0.10 ± 0.12 | 0.406 ^a |

P values were calculated by generalized linear regression using an additive model adjusted for sex and age. ^aParameters were additionally adjusted for BMI.

β est – coefficient estimate (compared to the wild-type genotype); SE – standard error

Associations with anthropometric and biochemical parameters

Only significant associations of anthropometric and biochemical parameters with the studied gene variants are presented in Table 4. The *FTO* rs9939609 genotype was strongly related to body weight, BMI, body circumferences, total body and trunk fat ($P < 0.001$). The *SEC16B* rs10913469 genotype was associated with an increased body weight, BMI, abdominal and arm circumferences ($P < 0.05$). Gender-stratified analyses revealed further associations. Only in boys, associations of body weight with *MC4R* rs12970134 ($P = 0.004$) and *MC4R* rs17782313 ($P = 0.014$) and an association of abdominal circumference with the rs17782313 variant ($P = 0.032$) were found. However, after additional ad-

justment for BMI, none of the above-mentioned associations remained statistically significant.

Discussion

We evaluated 11 previously reported gene variants and their associations with weight statuses in 1,443 Czech adolescents. The association of *FTO* variants in Czech adults has already been confirmed (Hubacek et al., 2008), in contrast to the other obesity susceptibility locus in insulin-induced gene 2, which was not associated (Hubáček et al., 2010). This is the first study of other obesity gene variants performed in Czech adolescents. We confirmed the strong association of *FTO* rs9939609 with overweight and obesity with a similar effect as in previously published studies performed in European descendants (Dina et al., 2007; Frayling et al., 2007). The 10 remaining SNPs have not been found to be related to obesity. These associations have already been confirmed in children and adolescents; however, mostly in larger studies and meta-analyses (Zhao et al., 2009; den Hoed et al., 2010). We assumed that we were not able to replicate the small effects (mostly explaining 1.12 % of the total variation for BMI Z-score) of the SNPs (Zhao et al., 2009). The *SEC16B* rs10913469 variant showed the same tendency as the *FTO* variant. We demonstrated that this SNP was associated with increased anthropometric parameters. However, we suppose that the low number of minor homozygotes in our cohort might have been limiting. Variants near *MC4R* were related to body weight and abdominal circumference, but only in boys. A recent study of eight common obesity variants also found gender-specific differences (Wang et al., 2012).

Our studied population included all weight categories (obese, overweight, normal weight and underweight), and thus we were also able to perform the case-control study with underweight as the opposite extreme of BMI variability. In the GWAS of Willer et al. (2009), the major allele of *TMEM18* rs7561317 was described as the obesity risk allele. Surprisingly, the results of our study demonstrated that the minor allele of this variant significantly increased the risk of being underweight. *TMEM18* is a DNA-binding protein that could possibly affect repression of the transcription of chromatin (Jurvansuu and Goldman, 2011). However, its involvement in the pathogenesis of obesity has not yet been elucidated. Our findings have to be confirmed by other independent studies. We are aware of the low frequency of the *TMEM18* minor allele. Nonetheless, we emphasize the importance of focusing further investigations on underweight individuals as well. Jacquemont et al. (2011) have recently published a study in which they suggested that severe obesity and underweight might share similar genetic background.

Metabolic syndrome

Abdominal obesity defined by waist circumference is usually considered as a crucial marker of MS (Bitsori et al., 2009). The prevalence of MS has been rapidly in-

creasing in overweight and obese individuals (Weiss et al., 2004). In our study, only overweight and obese adolescents fulfilled the IDF criteria for MS. Although several GWAS have identified SNPs related to the various metabolic traits in recent years (Newton-Cheh et al., 2009; Fox et al., 2012; Tukiainen et al., 2012), there is still a lack of studies focused on MS as a complex disorder.

We found an association between the *FTO* variant and abdominal obesity. However, the association did not remain significant after the adjustment for BMI, similarly to other studied anthropometric parameters. It seems that the *FTO* variant has an effect on BMI in general, but does not influence the body fat distribution (e.g. abdominal obesity) and related metabolic risks. Several studies investigated the association of SNPs in *FTO* with metabolic traits (Liem et al., 2010), but their findings were not consistent. In agreement with our results, Müller et al. (2008) found no association between the *FTO* variant and biochemical parameters. According to the meta-analyses performed by Wang et al. (2011) and Zhou et al. (2012), *FTO* variants were associated with MS but dependent on the used definition for the MS. A significant association in adult Europeans was only found when the Third Report of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel criteria (2002) of MS were applied.

According to our results, the *BDNF* rs925946 and the *MC4R* rs12970134 and rs17782313 variants increased the risk of MS. However, the association of *MC4R* rs12970134 seems to be mediated through *MC4R* rs17782313 because of the observed high linkage disequilibrium between these SNPs and a weaker association with MS for the rs12970134 variant. *BDNF* and *MC4R* variants found only in boys probably play a role in the development of abdominal obesity. *BDNF*, a member of the nerve growth factor family, is necessary for survival of striatal neurons in the brain and should be an important mediator of energy balance regulated by the *MC4R* gene (Zuccato et al., 2001; Xu et al., 2003). Evidences about the involvement of *BDNF* in the pathogenesis of MS have so far only been at the experimental level. Heterozygous knockout mice exhibited elevated levels of glucose, insulin and leptin (Duan et al., 2003). Human studies focused on the association of plasma *BDNF* with MS showed discrepancies (Levinger et al., 2008; Corripio et al., 2012). Sandholt et al. (2011) revealed association of *BDNF* rs925946 with elevated blood glucose, although more likely mediated through BMI. G protein-coupled *MC4R* is the key factor in the regulation of food intake and energy homeostasis in the hypothalamus (Marsh et al., 1999). rs17782313 is mapped at 188 kb downstream of the *MC4R* gene, but it is still unclear whether it modulates *MC4R* expression (Loos et al., 2008). The association of *MC4R* variants with MS and related traits has not been clearly demonstrated. However, in studies of males, rs17782313 was shown to be associated with lower HDL cholesterol (Kring et al., 2010) and elevated diastolic blood pres-

sure (Vogel et al., 2011). In agreement with our results, Zobel et al. (2009) found no associations with blood glucose, insulin, C-peptide and lipids in the study of 14,940 Danes.

PCSK1 is a neuroendocrine convertase that activates hormones and neuropeptides. Mutations in the *PCSK1* gene cause monogenic obesity accompanied by malabsorption and impaired glucose homeostasis (Jackson et al., 1997). In our cohort, the obesity risk allele of *PCSK1* rs6235 was less frequent in subjects with elevated blood glucose. A similar finding was shown in a study of middle-aged Danes, in whom the risk allele carriers had significantly lower fasting glucose (Gjesing et al., 2011). Our data support the finding of Gjesing and the hypothesis that the variants in *PCSK1* may be protective against type 2 diabetes.

In our study, most of the associations were only observed in boys, who further demonstrated a higher frequency of MS in comparison to girls. It is well known that abdominal obesity as the key component for MS is characteristic for men, in contrast to the gynoid obesity, which is more prevalent in women and is characterized by rare cardiometabolic complications (Canoy et al., 2004). Therefore, the gender-specific effect of obesity-related SNPs should be considered in the pathogenesis of abdominal obesity and MS. GWAS focused on abdominal subcutaneous and visceral fat or the waist-to-hip ratio also revealed some loci with strong sex interactions (Heid et al., 2010; Fox et al., 2012). Further studies are necessary to confirm these findings and extend knowledge about the involvement and possible interaction of *MC4R*, *BDNF* and *PCSK1* variants in the regulation of energy metabolism. Moreover, according to our results, we could hypothesize that *PCSK1* and *TMEM18* variants may contribute to the metabolically healthy obesity (Stefan et al., 2008).

In conclusion, in our cohort of 1,443 Czech adolescents, of the 11 studied gene variants, an association with obesity was only confirmed for the *FTO* variant. Interestingly, the *TMEM18* variant was associated with underweight. *MC4R* and *BDNF* variants increased the risk of MS, probably through their effect on fat distribution represented by abdominal obesity. The *PCSK1* variant was negatively associated with elevated blood glucose, and thus seems to have a protective role in the development of type 2 diabetes.

Acknowledgement

The authors report no conflicts of interest.

References

- Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J., Daly, M. J. (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **21**, 263-265.
- Benzinou, M., Creemers, J. W., Choquet, H., Lobbens, S., Dina, C., Durand, E., Guerardel, A., Boutin, P., Jouret, B., Heude, B., Balkau, B., Tichet, J., Marre, M., Potoczna, N., Horber, F., Le Stunff, C., Czernichow, S., Sandbaek, A., Lauritzen, T., Borch-Johnsen, K., Andersen, G., Kiess, W., Komer, A., Kovacs, P., Jacobson, P., Carlsson, L. M., Walley, A. J., Jorgensen, T., Hansen, T., Pedersen, O., Meyre, D., Froguel, P. (2008) Common nonsynonymous variants in *PCSK1* confer risk of obesity. *Nat. Genet.* **40**, 943-945.
- Bitsori, M., Linardakis, M., Tabakaki, M., Kafatos, A. (2009) Waist circumference as a screening tool for the identification of adolescents with the metabolic syndrome phenotype. *Int. J. Pediatr. Obes.* **4**, 325-331.
- Bokor, S., Frelut, M. L., Vania, A., Hadjiathanasiou, C. G., Anastasakou, M., Malecka-Tendera, E., Matusik, P., Molnar, D. (2008) Prevalence of metabolic syndrome in European obese children. *Int. J. Pediatr. Obes.* **3** (Suppl 2), 3-8.
- Canoy, D., Luben, R., Welch, A., Bingham, S., Wareham, N., Day, N., Khaw, K. T. (2004) Fat distribution, body mass index and blood pressure in 22,090 men and women in the Norfolk cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Norfolk) study. *J. Hypertens.* **22**, 2067-2074.
- Corripio, R., Gonzalez-Clemente, J. M., Jacobo, P. S., Silvia, N., Lluís, G., Joan, V., Assumpta, C. (2012) Plasma brain-derived neurotrophic factor in prepubertal obese children: results from a 2-year lifestyle intervention programme. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **77**, 715-720.
- den Hoed, M., Ekelund, U., Brage, S., Grontved, A., Zhao, J. H., Sharp, S. J., Ong, K. K., Wareham, N. J., Loos, R. J. (2010) Genetic susceptibility to obesity and related traits in childhood and adolescence: influence of loci identified by genome-wide association studies. *Diabetes* **59**, 2980-2988.
- Dina, C., Meyre, D., Gallina, S., Durand, E., Komer, A., Jacobson, P., Carlsson, L. M., Kiess, W., Vatin, V., Lecoœur, C., Delplanque, J., Vaillant, E., Pattou, F., Ruiz, J., Weill, J., Levy-Marchal, C., Horber, F., Potoczna, N., Hercberg, S., Le Stunff, C., Bougneres, P., Kovacs, P., Marre, M., Balkau, B., Cauchi, S., Chevre, J. C., Froguel, P. (2007) Variation in *FTO* contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat. Genet.* **39**, 724-726.
- Duan, W., Guo, Z., Jiang, H., Ware, M., Mattson, M. P. (2003) Reversal of behavioral and metabolic abnormalities, and insulin resistance syndrome, by dietary restriction in mice deficient in brain-derived neurotrophic factor. *Endocrinology* **144**, 2446-2453.
- Fox, C. S., Liu, Y., White, C. C., Feitosa, M., Smith, A. V., Heard-Costa, N., Lohman, K., Johnson, A. D., Foster, M. C., Greenawalt, D. M., Griffin, P., Ding, J., Newman, A. B., Tyllavsky, F., Miljkovic, I., Kritchevsky, S. B., Launer, L., Garcia, M., Eiriksdottir, G., Carr, J. J., Gudnason, V., Harris, T. B., Cupples, L. A., Borecki, I. B. (2012) Genome-wide association for abdominal subcutaneous and visceral adipose reveals a novel locus for visceral fat in women. *PLoS Genet.* **8**, e1002695.
- Frayling, T. M., Timpson, N. J., Weedon, M. N., Zeggini, E., Freathy, R. M., Lindgren, C. M., Perry, J. R., Elliott, K. S., Lango, H., Rayner, N. W., Shields, B., Harries, L. W., Barrett, J. C., Ellard, S., Groves, C. J., Knight, B., Patch, A. M., Ness, A. R., Ebrahim, S., Lawlor, D. A., Ring, S. M., Ben-Shlomo, Y., Jarvelin, M. R., Sovio, U., Bennett, A. J., Melzer, D., Ferrucci, L., Loos, R. J., Barroso, I., Wareham, N. J., Karpe, F., Owen, K. R., Cardon, L. R., Walker, M., Hitman, G. A., Palmer, C. N., Doney, A. S., Morris, A. D., Smith, G. D., Hattersley, A. T., McCarthy, M. I. (2007) A

- common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* **316**, 889-894.
- Gjesing, A. P., Vestmar, M. A., Jorgensen, T., Henri, M., Holst, J. J., Witte, D. R., Hansen, T., Pedersen, O. (2011) The effect of PCSK1 variants on waist, waist-hip ratio and glucose metabolism is modified by sex and glucose tolerance status. *PLoS One* **6**, e23907.
- Haas, G. M., Liepold, E., Schwandt, P. (2011) Percentile curves for fat patterning in German adolescents. *World J. Pediatr.* **7**, 16-23.
- Heid, I. M., Jackson, A. U., Randall, J. C., Winkler, T. W., Qi, L., Steinthorsdottir, V., Thorleifsson, G., Zillikens, M. C., Speliotes, E. K., Magi, R., Workalemahu, T., White, C. C., Bouatia-Naji, N., Harris, T. B., Berndt, S. I., Ingelsson, E., Willer, C. J., Weedon, M. N., Luan, J., Vedantam, S., Esko, T., Kilpelainen, T. O., Kutalik, Z., Li, S., Monda, K. L., Dixon, A. L., Holmes, C. C., Kaplan, L. M., Liang, L., Min, J. L., Moffatt, M. F., Molony, C., Nicholson, G., Schadt, E. E., Zondervan, K. T., Feitosa, M. F., Ferreira, T., Lango Allen, H., Weyant, R. J., Wheeler, E., Wood, A. R., Estrada, K., Goddard, M. E., Lettre, G., Mangino, M., Nyholt, D. R., Purcell, S., Smith, A. V., Visscher, P. M., Yang, J., McCarroll, S. A., Nemes, J., Voight, B. F., Absher, D., Amin, N., Aspelund, T., Coin, L., Glazer, N. L., Hayward, C., Heard-Costa, N. L., Hottenga, J. J., Johansson, A., Johnson, T., Kaakinen, M., Kapur, K., Ketkar, S., Knowles, J. W., Kraft, P., Kraja, A. T., Lamina, C., Leitzmann, M. F., McKnight, B., Morris, A. P., Ong, K. K., Perry, J. R., Peters, M. J., Polasek, O., Prokopenko, I., Rayner, N. W., Ripatti, S., Rivadeneira, F., Robertson, N. R., Sanna, S., Sovio, U., Surakka, I., Teumer, A., van Wingerden, S., Vitart, V., Zhao, J. H., Cavalcanti-Proenca, C., Chines, P. S., Fisher, E., Kulzer, J. R., Lecoq, C., Narisu, N., Sandholt, C., Scott, L. J., Silander, K., Stark, K., Tammesoo, M. L., Teslovich, T. M., Timpson, N. J., Watanabe, R. M., Welch, R., Chasman, D. I., Cooper, M. N., Jansson, J. O., Kettunen, J., Lawrence, R. W., Pellikka, N., Perola, M., Vandenput, L., Alavere, H., Almgren, P., Atwood, L. D., Bennett, A. J., Biffar, R., Bonnycastle, L. L., Bornstein, S. R., Buchanan, T. A., Campbell, H., Day, I. N., Dei, M., Dorr, M., Elliott, P., Erdos, M. R., Eriksson, J. G., Freimer, N. B., Fu, M., Gaget, S., Geus, E. J., Gjesing, A. P., Grallert, H., Grassler, J., Groves, C. J., Guiducci, C., Hartikainen, A. L., Hassanali, N., Havulinna, A. S., Herzig, K. H., Hicks, A. A., Hui, J., Igl, W., Jousilahti, P., Jula, A., Kajantie, E., Kinnunen, L., Kolcic, I., Koskinen, S., Kovacs, P., Kroemer, H. K., Krzjelj, V., Kuusisto, J., Kvaloy, K., Laitinen, J., Lantieri, O., Lathrop, G. M., Lokki, M. L., Luben, R. N., Ludwig, B., McArdle, W. L., McCarthy, A., Morken, M. A., Nelis, M., Neville, M. J., Pare, G., Parker, A. N., Peden, J. F., Pichler, I., Pietilainen, K. H., Platou, C. G., Pouta, A., Ridderstrale, M., Samani, N. J., Saramies, J., Sinisalo, J., Smit, J. H., Strawbridge, R. J., Stringham, H. M., Swift, A. J., Teder-Laving, M., Thomson, B., Usala, G., van Meurs, J. B., van Ommen, G. J., Vatin, V., Volpato, C. B., Wallaschofski, H., Walters, G. B., Widen, E., Wild, S. H., Willemsen, G., Witte, D. R., Zgaga, L., Zitting, P., Beilby, J. P., James, A. L., Kahonen, M., Lehtimäki, T., Nieminen, M. S., Ohlsson, C., Palmer, L. J., Raitakari, O., Ridker, P. M., Stumvoll, M., Tonjes, A., Viikari, J., Balkau, B., Ben-Shlomo, Y., Bergman, R. N., Boeing, H., Smith, G. D., Ebrahim, S., Froguel, P., Hansen, T., Hengstenberg, C., Hveem, K., Isomaa, B., Jorgensen, T., Karpe, F., Khaw, K. T., Laakso, M., Lawlor, D. A., Marre, M., Meitinger, T., Metspalu, A., Midtjell, K., Pedersen, O., Salomaa, V., Schwarz, P. E., Tuomi, T., Tuomilehto, J., Valle, T. T., Wareham, N. J., Arnold, A. M., Beckmann, J. S., Bergmann, S., Boerwinkle, E., Boomsma, D. I., Caulfield, M. J., Collins, F. S., Eiriksdottir, G., Gudnason, V., Gyllensten, U., Hamsten, A., Hattersley, A. T., Hofman, A., Hu, F. B., Illig, T., Iribarren, C., Jarvelin, M. R., Kao, W. H., Kaprio, J., Launer, L. J., Munroe, P. B., Oostra, B., Penninx, B. W., Pramstaller, P. P., Psaty, B. M., Quertermous, T., Rissanen, A., Rudan, I., Shuldiner, A. R., Soranzo, N., Spector, T. D., Syvanen, A. C., Uda, M., Uitterlinden, A., Volzke, H., Vollenweider, P., Wilson, J. F., Wittman, J. C., Wright, A. F., Abecasis, G. R., Boehnke, M., Borecki, I. B., Deloukas, P., Frayling, T. M., Groop, L. C., Haritunians, T., Hunter, D. J., Kaplan, R. C., North, K. E., O'Connell, J. R., Peltonen, L., Schlessinger, D., Strachan, D. P., Hirschhorn, J. N., Assimes, T. L., Wichmann, H. E., Thorsteinsdottir, U., van Duijn, C. M., Stefansson, K., Cupples, L. A., Loos, R. J., Barroso, I., McCarthy, M. I., Fox, C. S., Mohlke, K. L., Lindgren, C. M. (2010) Meta-analysis identifies 13 new loci associated with waist-hip ratio and reveals sexual dimorphism in the genetic basis of fat distribution. *Nat. Genet.* **42**, 949-960.
- Hubacek, J. A., Bohuslavova, R., Kuthanova, L., Kubinova, R., Peasey, A., Pikhart, H., Marmot, M. G., Bobak, M. (2008) The FTO gene and obesity in a large Eastern European population sample: the HAPIEE study. *Obesity (Silver Spring)* **16**, 2764-2766.
- Hubáček, J. A., Kuthanová, L., Bohuslavová, R., Adámková, V., Lánská, V., Meitinger, T., Pfeuffer, A. (2010) INSG2 promoter variant, obesity markers and lipid parameters – no association in a large Slavonic Caucasian population sample. *Folia Biol. (Praha)* **56**, 131-134.
- Jackson, R. S., Creemers, J. W., Ohagi, S., Raffin-Sanson, M. L., Sanders, L., Montague, C. T., Hutton, J. C., O'Rahilly, S. (1997) Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat. Genet.* **16**, 303-306.
- Jacquemont, S., Reymond, A., Zufferey, F., Harewood, L., Walters, R. G., Kutalik, Z., Martinet, D., Shen, Y., Valsesia, A., Beckmann, N. D., Thorleifsson, G., Belfiore, M., Bouquillon, S., Campion, D., de Leeuw, N., de Vries, B. B., Esko, T., Fernandez, B. A., Fernandez-Aranda, F., Fernandez-Real, J. M., Gratacos, M., Guilmatre, A., Hoyer, J., Jarvelin, M. R., Kooy, R. F., Kurg, A., Le Caignec, C., Mannik, K., Platt, O. S., Sanlaville, D., Van Haelst, M. M., Villatoro Gomez, S., Walha, F., Wu, B. L., Yu, Y., Aboura, A., Addor, M. C., Alembik, Y., Antonarakis, S. E., Arveiler, B., Barth, M., Bednarek, N., Bena, F., Bergmann, S., Beri, M., Bernardini, L., Blaumeiser, B., Bonneau, D., Bottani, A., Boute, O., Brunner, H. G., Cailley, D., Callier, P., Chiesa, J., Chrast, J., Coin, L., Coutton, C., Cuisset, J. M., Cuvellier, J. C., David, A., de Fremerville, B., Delobel, B., Delrue, M. A., Demeer, B., Descamps, D., Didelot, G., Dieterich, K., Disciglio, V., Doco-Fenzy, M., Drunat, S., Duban-Bedu, B., Dubourg, C., El-Sayed Moustafa, J. S., Elliott, P., Faas, B. H., Faivre, L., Faudet, A., Fellmann, F., Ferrarini, A., Fisher, R., Flori, E., Forer, L., Gaillard, D.,

- Gerard, M., Gieger, C., Gimelli, S., Gimelli, G., Grabe, H. J., Guichet, A., Guillin, O., Hartikainen, A. L., Heron, D., Hippolyte, L., Holder, M., Homuth, G., Isidor, B., Jaillard, S., Jaros, Z., Jimenez-Murcia, S., Helas, G. J., Jonveaux, P., Kaksonen, S., Keren, B., Kloss-Brandstatter, A., Knoers, N. V., Koolen, D. A., Kroisel, P. M., Kronenberg, F., Labalme, A., Landais, E., Lapi, E., Layet, V., Legallic, S., Leheup, B., Leube, B., Lewis, S., Lucas, J., MacDermot, K. D., Magnusson, P., Marshall, C., Mathieu-Dramard, M., McCarthy, M. I., Meitinger, T., Mencarelli, M. A., Merla, G., Moerman, A., Mooser, V., Morice-Picard, F., Mucciolo, M., Nauck, M., Ndiaye, N. C., Nordgren, A., Pasquier, L., Petit, F., Pfundt, R., Plessis, G., Rajcan-Separovic, E., Ramelli, G. P., Rauch, A., Ravazzolo, R., Reis, A., Renieri, A., Richart, C., Ried, J. S., Rieubland, C., Roberts, W., Roetzer, K. M., Rooryck, C., Rossi, M., Saemundsen, E., Satre, V., Schurmann, C., Sigurdsson, E., Stavropoulos, D. J., Stefansson, H., Tengstrom, C., Thorsteinsdottir, U., Tinahones, F. J., Touraine, R., Vallee, L., van Binsbergen, E., Van der Aa, N., Vincent-Delorme, C., Visvikis-Siest, S., Vollenweider, P., Volzke, H., Vulto-van Silfhout, A. T., Waeber, G., Wallgren-Pettersson, C., Witwicki, R. M., Zwolinski, S., Andrieux, J., Estivill, X., Gusella, J. F., Gustafsson, O., Metspalu, A., Scherer, S. W., Stefansson, K., Blakemore, A. I., Beckmann, J. S., Froguel, P. (2011) Mirror extreme BMI phenotypes associated with gene dosage at the chromosome 16p11.2 locus. *Nature* **478**, 97-102.
- Jurvansuu, J. M., Goldman, A. (2011) Obesity risk gene TMEM18 encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *PLoS One* **6**, e25317.
- Katzmarzyk, P. T., Perusse, L., Malina, R. M., Bergeron, J., Despres, J. P., Bouchard, C. (2001) Stability of indicators of the metabolic syndrome from childhood and adolescence to young adulthood: the Quebec Family Study. *J. Clin. Epidemiol.* **54**, 190-195.
- Kobzova, J., Vignerova, J., Blaha, P., Krejcovsky, L., Riedlova, J. (2004) The 6th nationwide anthropological survey of children and adolescents in the Czech Republic in 2001. *Cent. Eur. J. Public Health* **12**, 126-130.
- Kring, S. I., Holst, C., Toubro, S., Astrup, A., Hansen, T., Pedersen, O., Sorensen, T. I. (2010) Common variants near MC4R in relation to body fat, body fat distribution, metabolic traits and energy expenditure. *Int. J. Obes. (Lond)* **34**, 182-189.
- Levinger, I., Goodman, C., Matthews, V., Hare, D. L., Jerums, G., Garnham, A., Selig, S. (2008) BDNF, metabolic risk factors, and resistance training in middle-aged individuals. *Med. Sci. Sports Exerc.* **40**, 535-541.
- Liem, E. T., Vonk, J. M., Sauer, P. J., van der Steege, G., Oosterom, E., Stolk, R. P., Snieder, H. (2010) Influence of common variants near INSIG2, in FTO, and near MC4R genes on overweight and the metabolic profile in adolescence: the TRAILS (TRacking Adolescents' Individual Lives Survey) Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **91**, 321-328.
- Lobstein, T., Baur, L., Uauy, R. (2004) Obesity in children and young people: a crisis in public health. *Obes. Rev.* **5** (Suppl 1), 4-104.
- Loos, R. J., Lindgren, C. M., Li, S., Wheeler, E., Zhao, J. H., Prokopenko, I., Inouye, M., Freathy, R. M., Attwood, A. P., Beckmann, J. S., Berndt, S. I., Jacobs, K. B., Chanock, S. J., Hayes, R. B., Bergmann, S., Bennett, A. J., Bingham, S. A., Bochud, M., Brown, M., Cauchi, S., Connell, J. M., Cooper, C., Smith, G. D., Day, I., Dina, C., De, S., Dermitzakis, E. T., Doney, A. S., Elliott, K. S., Elliott, P., Evans, D. M., Sadaf Farooqi, I., Froguel, P., Ghorri, J., Groves, C. J., Gwilliam, R., Hadley, D., Hall, A. S., Hattersley, A. T., Hebebrand, J., Heid, I. M., Lamina, C., Gieger, C., Illig, T., Meitinger, T., Wichmann, H. E., Herrera, B., Hinney, A., Hunt, S. E., Jarvelin, M. R., Johnson, T., Jolley, J. D., Karpe, F., Keniry, A., Khaw, K. T., Luben, R. N., Mangino, M., Marchini, J., McArdle, W. L., McGinnis, R., Meyre, D., Munroe, P. B., Morris, A. D., Ness, A. R., Neville, M. J., Nica, A. C., Ong, K. K., O'Rahilly, S., Owen, K. R., Palmer, C. N., Papadakis, K., Potter, S., Pouta, A., Qi, L., Randall, J. C., Rayner, N. W., Ring, S. M., Sandhu, M. S., Scherag, A., Sims, M. A., Song, K., Soranzo, N., Speliotes, E. K., Syddall, H. E., Teichmann, S. A., Timpon, N. J., Tobias, J. H., Uda, M., Vogel, C. I., Wallace, C., Waterworth, D. M., Weedon, M. N., Willer, C. J., Wraight, Yuan, X., Zeggini, E., Hirschhorn, J. N., Strachan, D. P., Ouwehand, W. H., Caulfield, M. J., Samani, N. J., Frayling, T. M., Vollenweider, P., Waeber, G., Mooser, V., Deloukas, P., McCarthy, M. I., Wareham, N. J., Barroso, I., Kraft, P., Hankinson, S. E., Hunter, D. J., Hu, F. B., Lyon, H. N., Voight, B. F., Ridderstrale, M., Groop, L., Scheet, P., Sanna, S., Abecasis, G. R., Albai, G., Nagaraja, R., Schlessinger, D., Jackson, A. U., Tuomilehto, J., Collins, F. S., Boehnke, M., Mohlke, K. L. (2008) Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat. Genet.* **40**, 768-775.
- Marsh, D. J., Hollopeter, G., Huszar, D., Lauffer, R., Yagaloff, K. A., Fisher, S. L., Burn, P., Palmiter, R. D. (1999) Response of melanocortin-4 receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides. *Nat. Genet.* **21**, 119-122.
- Müller, T. D., Hinney, A., Scherag, A., Nguyen, T. T., Schreiner, F., Schafer, H., Hebebrand, J., Roth, C. L., Reinehr, T. (2008) 'Fat mass and obesity associated' gene (FTO): no significant association of variant rs9939609 with weight loss in a lifestyle intervention and lipid metabolism markers in German obese children and adolescents. *BMC Med. Genet.* **9**, 85.
- Newton-Cheh, C., Johnson, T., Gateva, V., Tobin, M. D., Bochud, M., Coin, L., Najjar, S. S., Zhao, J. H., Heath, S. C., Eyheramendy, S., Papadakis, K., Voight, B. F., Scott, L. J., Zhang, F., Farrall, M., Tanaka, T., Wallace, C., Chambers, J. C., Khaw, K. T., Nilsson, P., van der Harst, P., Polidoro, S., Grobbee, D. E., Onland-Moret, N. C., Bots, M. L., Wain, L. V., Elliott, K. S., Teumer, A., Luan, J., Lucas, G., Kuusisto, J., Burton, P. R., Hadley, D., McArdle, W. L., Brown, M., Dominiczak, A., Newhouse, S. J., Samani, N. J., Webster, J., Zeggini, E., Beckmann, J. S., Bergmann, S., Lim, N., Song, K., Vollenweider, P., Waeber, G., Waterworth, D. M., Yuan, X., Groop, L., Orho-Melander, M., Allione, A., Di Gregorio, A., Guarrera, S., Panico, S., Ricceri, F., Romanazzi, V., Sacerdote, C., Vineis, P., Barroso, I., Sandhu, M. S., Luben, R. N., Crawford, G. J., Jousilahti, P., Perola, M., Boehnke, M., Bonnycastle, L. L., Collins, F. S., Jackson, A. U., Mohlke, K. L., Stringham, H. M., Valle, T. T., Willer, C. J., Bergman, R. N., Morken, M. A., Doring, A., Gieger, C., Illig, T., Meitinger, T., Org, E., Pfeufer, A., Wichmann, H. E., Kathiresan, S., Marrugat, J., O'Donnell, C. J., Schwartz, S. M., Siscovick, D. S., Subirana, I., Freimer, N. B.,

- Hartikainen, A. L., McCarthy, M. I., O'Reilly, P. F., Peltonen, L., Pouta, A., de Jong, P. E., Snieder, H., van Gilst, W. H., Clarke, R., Goel, A., Hamsten, A., Peden, J. F., Seedorf, U., Syvanen, A. C., Tognoni, G., Lakatta, E. G., Sanna, S., Scheet, P., Schlessinger, D., Scuteri, A., Dorr, M., Ernst, F., Felix, S. B., Homuth, G., Lorbeer, R., Reffelmann, T., Rettig, R., Volker, U., Galan, P., Gut, I. G., Hercberg, S., Lathrop, G. M., Zelenika, D., Deloukas, P., Soranzo, N., Williams, F. M., Zhai, G., Salomaa, V., Laakso, M., Elosua, R., Forouhi, N. G., Volzke, H., Uiterwaal, C. S., van der Schouw, Y. T., Numans, M. E., Matullo, G., Navis, G., Berglund, G., Bingham, S. A., Kooner, J. S., Connell, J. M., Bandinelli, S., Ferrucci, L., Watkins, H., Spector, T. D., Tuomilehto, J., Altshuler, D., Strachan, D. P., Laan, M., Meneton, P., Wareham, N. J., Uda, M., Jarvelin, M. R., Mooser, V., Melander, O., Loos, R. J., Elliott, P., Abecasis, G. R., Caulfield, M., Munroe, P. B. (2009) Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure. *Nat. Genet.* **41**, 666-676.
- Sandholt, C. H., Vestmar, M. A., Bille, D. S., Borglykke, A., Almind, K., Hansen, L., Sandbaek, A., Lauritzen, T., Witte, D., Jorgensen, T., Pedersen, O., Hansen, T. (2011) Studies of metabolic phenotypic correlates of 15 obesity associated gene variants. *PLoS One* **6**, e23531.
- Speliotes, E. K., Willer, C. J., Berndt, S. I., Monda, K. L., Thorleifsson, G., Jackson, A. U., Lango Allen, H., Lindgren, C. M., Luan, J., Magi, R., Randall, J. C., Vedantam, S., Winkler, T. W., Qi, L., Workalemahu, T., Heid, I. M., Steinthorsdottir, V., Stringham, H. M., Weedon, M. N., Wheeler, E., Wood, A. R., Ferreira, T., Weyant, R. J., Segre, A. V., Estrada, K., Liang, L., Nemes, J., Park, J. H., Gustafsson, S., Kilpelainen, T. O., Yang, J., Bouatia-Naji, N., Esko, T., Feitosa, M. F., Kutalik, Z., Mangino, M., Raychaudhuri, S., Scherag, A., Smith, A. V., Welch, R., Zhao, J. H., Aben, K. K., Absher, D. M., Amin, N., Dixon, A. L., Fisher, E., Glazer, N. L., Goddard, M. E., Heard-Costa, N. L., Hoesel, V., Hottenga, J. J., Johansson, A., Johnson, T., Ketkar, S., Lamina, C., Li, S., Moffatt, M. F., Myers, R. H., Narisu, N., Perry, J. R., Peters, M. J., Preuss, M., Ripatti, S., Rivadeneira, F., Sandholt, C., Scott, L. J., Timpson, N. J., Tyrer, J. P., van Wingerden, S., Watanabe, R. M., White, C. C., Wiklund, F., Barlassina, C., Chasman, D. I., Cooper, M. N., Jansson, J. O., Lawrence, R. W., Pellikka, N., Prokopenko, I., Shi, J., Thiering, E., Alavere, H., Alibrandi, M. T., Almgren, P., Arnold, A. M., Aspelund, T., Atwood, L. D., Balkau, B., Balmforth, A. J., Bennett, A. J., Ben-Shlomo, Y., Bergman, R. N., Bergmann, S., Biebermann, H., Blakemore, A. I., Boes, T., Bonnycastle, L. L., Bornstein, S. R., Brown, M. J., Buchanan, T. A., Busonero, F., Campbell, H., Cappuccino, F. P., Cavalcanti-Proenca, C., Chen, Y. D., Chen, C. M., Chines, P. S., Clarke, R., Coin, L., Connell, J., Day, I. N., den Heijer, M., Duan, J., Ebrahim, S., Elliott, P., Elosua, R., Eiriksdottir, G., Erdos, M. R., Eriksson, J. G., Facheris, M. F., Felix, S. B., Fischer-Posovszky, P., Folsom, A. R., Friedrich, N., Freimer, N. B., Fu, M., Gaget, S., Gejman, P. V., Geus, E. J., Gieger, C., Gjesing, A. P., Goel, A., Goyette, P., Grallert, H., Grassler, J., Greenawald, D. M., Groves, C. J., Gudnason, V., Guiducci, C., Hartikainen, A. L., Hassanali, N., Hall, A. S., Havulinna, A. S., Hayward, C., Heath, A. C., Hengstenberg, C., Hicks, A. A., Hinney, A., Hofman, A., Homuth, G., Hui, J., Igl, W., Iribarren, C., Isomaa, B., Jacobs, K. B., Jarick, I., Jewell, E., John, U., Jorgensen, T., Jousilahti, P., Jula, A., Kaakinen, M., Kajantie, E., Kaplan, L. M., Kathiresan, S., Kettunen, J., Kinnunen, L., Knowles, J. W., Kolcic, I., Konig, I. R., Koskinen, S., Kovacs, P., Kuusisto, J., Kraft, P., Kvaloy, K., Laitinen, J., Lantieri, O., Lanzani, C., Launer, L. J., Lecoeur, C., Lehtimäki, T., Lettre, G., Liu, J., Lokki, M. L., Lorentzon, M., Luben, R. N., Ludwig, B., Manunta, P., Marek, D., Marre, M., Martin, N. G., McArdle, W. L., McCarthy, A., McKnight, B., Meitinger, T., Melander, O., Meyre, D., Midhjelld, K., Montgomery, G. W., Morken, M. A., Morris, A. P., Mulic, R., Ngwa, J. S., Nelis, M., Neville, M. J., Nyholt, D. R., O'Donnell, C. J., O'Rahilly, S., Ong, K. K., Oostra, B., Pare, G., Parker, A. N., Perola, M., Pichler, I., Pietiläinen, K. H., Platou, C. G., Polasek, O., Pouta, A., Raffelt, S., Raitakari, O., Rayner, N. W., Ridderstrale, M., Rief, W., Ruokonen, A., Robertson, N. R., Rzehak, P., Salomaa, V., Sanders, A. R., Sandhu, M. S., Sanna, S., Saramies, J., Savolainen, M. J., Scherag, S., Schipf, S., Schreiber, S., Schunkert, H., Silander, K., Sinisalo, J., Siscovick, D. S., Smit, J. H., Soranzo, N., Sovio, U., Stephens, J., Surakka, I., Swift, A. J., Tammesoo, M. L., Tardif, J. C., Teder-Laving, M., Teslovich, T. M., Thompson, J. R., Thomson, B., Tonjes, A., Tuomi, T., van Meurs, J. B., van Ommen, G. J., Vatn, V., Viikari, J., Visvikis-Siest, S., Vitart, V., Vogel, C. I., Voight, B. F., Waite, L. L., Wallaschofski, H., Walters, G. B., Widen, E., Wiegand, S., Wild, S. H., Willemsen, G., Witte, D. R., Witteman, J. C., Xu, J., Zhang, Q., Zgaga, L., Ziegler, A., Zitting, P., Beilby, J. P., Farooqi, I. S., Hebebrand, J., Huikuri, H. V., James, A. L., Kahonen, M., Levinson, D. F., Macciardi, F., Nieminen, M. S., Ohlsson, C., Palmer, L. J., Ridker, P. M., Stumvoll, M., Beckmann, J. S., Boeing, H., Boerwinkle, E., Boomsma, D. I., Caulfield, M. J., Chanock, S. J., Collins, F. S., Cupples, L. A., Smith, G. D., Erdmann, J., Froguel, P., Gronberg, H., Gyllensten, U., Hall, P., Hansen, T., Harris, T. B., Hattersley, A. T., Hayes, R. B., Heinrich, J., Hu, F. B., Hveem, K., Illig, T., Jarvelin, M. R., Kaprio, J., Karpe, F., Khaw, K. T., Kiemeny, L. A., Krude, H., Laakso, M., Lawlor, D. A., Metspalu, A., Munroe, P. B., Ouwehand, W. H., Pedersen, O., Penninx, B. W., Peters, A., Pramstaller, P. P., Quertermous, T., Reinehr, T., Rissanen, A., Rudan, I., Samani, N. J., Schwarz, P. E., Shuldiner, A. R., Spector, T. D., Tuomilehto, J., Uda, M., Uitterlinden, A., Valle, T. T., Wabitsch, M., Waeber, G., Wareham, N. J., Watkins, H., Wilson, J. F., Wright, A. F., Zillikens, M. C., Chatterjee, N., McCarroll, S. A., Purcell, S., Schadt, E. E., Visscher, P. M., Assimes, T. L., Borecki, I. B., Deloukas, P., Fox, C. S., Groop, L. C., Haritunians, T., Hunter, D. J., Kaplan, R. C., Mohlke, K. L., O'Connell, J. R., Peltonen, L., Schlessinger, D., Strachan, D. P., van Duijn, C. M., Wichmann, H. E., Frayling, T. M., Thorsteinsdottir, U., Abecasis, G. R., Barroso, I., Boehnke, M., Stefansson, K., North, K. E., McCarthy, M. I., Hirschhorn, J. N., Ingelsson, E., Loos, R. J. (2010) Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat. Genet.* **42**, 937-948.
- Stefan, N., Kantartzis, K., Machann, J., Schick, F., Thamer, C., Rittig, K., Balletshofer, B., Machicao, F., Fritsche, A., Haring, H. U. (2008) Identification and characterization of metabolically benign obesity in humans. *Arch. Intern. Med.* **168**, 1609-1616.

- Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. (2002) *Circulation* **106**, 3143-3421.
- Thorleifsson, G., Walters, G. B., Gudbjartsson, D. F., Steintorsdottir, V., Sulem, P., Helgadóttir, A., Styrkarsdóttir, U., Gretarsdóttir, S., Thorlacius, S., Jonsdóttir, I., Jonsdóttir, T., Olafsdóttir, E. J., Olafsdóttir, G. H., Jonsson, T., Jonsson, F., Borch-Johnsen, K., Hansen, T., Andersen, G., Jorgensen, T., Lauritzen, T., Aben, K. K., Verbeek, A. L., Roeleveld, N., Kampman, E., Yanek, L. R., Becker, L. C., Tryggvadóttir, L., Rafnar, T., Becker, D. M., Gulcher, J., Kiemeneý, L. A., Pedersen, O., Kong, A., Thorsteinsdóttir, U., Stefansson, K. (2009) Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat. Genet.* **41**, 18-24.
- Tukiainen, T., Kettunen, J., Kangas, A. J., Lytikainen, L. P., Soininen, P., Sarin, A. P., Tikkanen, E., O'Reilly, P. F., Savolainen, M. J., Kaski, K., Pouta, A., Jula, A., Lehtimäki, T., Kahonen, M., Viikari, J., Taskinen, M. R., Jauhiainen, M., Eriksson, J. G., Raitakari, O., Salomaa, V., Jarvelin, M. R., Perola, M., Palotie, A., Ala-Korpela, M., Ripatti, S. (2012) Detailed metabolic and genetic characterization reveals new associations for 30 known lipid loci. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 1444-1455.
- Vogel, C. I., Boes, T., Reinehr, T., Roth, C. L., Scherag, S., Scherag, A., Hebebrand, J., Hinney, A. (2011) Common variants near MC4R: exploring gender effects in overweight and obese children and adolescents participating in a lifestyle intervention. *Obes. Facts* **4**, 67-75.
- Wang, H., Dong, S., Xu, H., Qian, J., Yang, J. (2011) Genetic variants in FTO associated with metabolic syndrome: a meta- and gene-based analysis. *Mol. Biol. Rep.* **39**, 5691-5698.
- Wang, J., Mei, H., Chen, W., Jiang, Y., Sun, W., Li, F., Fu, Q., Jiang, F. (2012) Study of eight GWAS-identified common variants for association with obesity-related indices in Chinese children at puberty. *Int. J. Obes. (Lond.)* **36**, 542-547.
- Weiss, R., Dziura, J., Burgert, T. S., Tamborlane, W. V., Taksali, S. E., Yeckel, C. W., Allen, K., Lopes, M., Savoye, M., Morrison, J., Sherwin, R. S., Caprio, S. (2004) Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N. Engl. J. Med.* **350**, 2362-2374.
- Willer, C. J., Speliotes, E. K., Loos, R. J., Li, S., Lindgren, C. M., Heid, I. M., Berndt, S. I., Elliott, A. L., Jackson, A. U., Lamina, C., Lettre, G., Lim, N., Lyon, H. N., McCarroll, S. A., Papadakis, K., Qi, L., Randall, J. C., Roccacaccia, R. M., Sanna, S., Scheet, P., Weedon, M. N., Wheeler, E., Zhao, J. H., Jacobs, L. C., Prokopenko, I., Soranzo, N., Tanaka, T., Timpson, N. J., Almgren, P., Bennett, A., Bergman, R. N., Bingham, S. A., Bonnycastle, L. L., Brown, M., Burt, N. P., Chines, P., Coin, L., Collins, F. S., Connell, J. M., Cooper, C., Smith, G. D., Dennison, E. M., Deodhar, P., Elliott, P., Erdos, M. R., Estrada, K., Evans, D. M., Gianniny, L., Gieger, C., Gillson, C. J., Guiducci, C., Hackett, R., Hadley, D., Hall, A. S., Havulinna, A. S., Hebebrand, J., Hofman, A., Isomaa, B., Jacobs, K. B., Johnson, T., Jousilahti, P., Jovanovic, Z., Khaw, K. T., Kraft, P., Kuokkanen, M., Kuusisto, J., Laitinen, J., Lakatta, E. G., Luan, J., Luben, R. N., Mangino, M., McArdle, W. L., Meitinger, T., Mulas, A., Munroe, P. B., Narisu, N., Ness, A. R., Northstone, K., O'Rahilly, S., Purmann, C., Rees, M. G., Ridderstrale, M., Ring, S. M., Rivadeneira, F., Ruokonen, A., Sandhu, M. S., Saramies, J., Scott, L. J., Scuteri, A., Silander, K., Sims, M. A., Song, K., Stephens, J., Stevens, S., Stringham, H. M., Tung, Y. C., Valle, T. T., Van Duijn, C. M., Vimalaswaran, K. S., Vollenweider, P., Waeber, G., Wallace, C., Watanabe, R. M., Waterworth, D. M., Watkins, N., Witterman, J. C., Zeggini, E., Zhai, G., Zillikens, M. C., Altshuler, D., Caulfield, M. J., Chanock, S. J., Farooqi, I. S., Ferrucci, L., Guralnik, J. M., Hattersley, A. T., Hu, F. B., Jarvelin, M. R., Laakso, M., Mooser, V., Ong, K. K., Ouwehand, W. H., Salomaa, V., Samani, N. J., Spector, T. D., Tuomi, T., Tuomilehto, J., Uda, M., Uitterlinden, A. G., Wareham, N. J., Deloukas, P., Frayling, T. M., Groop, L. C., Hayes, R. B., Hunter, D. J., Mohlke, K. L., Peltonen, L., Schlessinger, D., Strachan, D. P., Wichmann, H. E., McCarthy, M. I., Boehnke, M., Barroso, I., Abecasis, G. R., Hirschhorn, J. N. (2009) Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat. Genet.* **41**, 25-34.
- Xu, B., Goulding, E. H., Zang, K., Cepoi, D., Cone, R. D., Jones, K. R., Tecott, L. H., Reichardt, L. F. (2003) Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat. Neurosci.* **6**, 736-742.
- Zamrazilova, H., Hlavaty, P., Dusatkova, L., Sedlackova, B., Hainerova, I. A., Kunesova, M., Skoch, A., Hajek, M., Hainer, V. (2010) A new simple method for estimating trunk and visceral fat by bioelectrical impedance: comparison with magnetic resonance imaging and dual X-ray absorptiometry in Czech adolescents. *Cas. Lek. Cesk.* **149**, 417-422. (in Czech)
- Zhao, J., Bradfield, J. P., Li, M., Wang, K., Zhang, H., Kim, C. E., Annaiah, K., Glessner, J. T., Thomas, K., Garris, M., Frackelton, E. C., Otiemo, F. G., Shaner, J. L., Smith, R. M., Chiavacci, R. M., Berkowitz, R. I., Hakonarson, H., Grant, S. F. (2009) The role of obesity-associated loci identified in genome-wide association studies in the determination of pediatric BMI. *Obesity (Silver Spring)* **17**, 2254-2257.
- Zhou, D., Liu, H., Zhou, M., Wang, S., Zhang, J., Liao, L., He, F. (2012) Common variant (rs9939609) in the FTO gene is associated with metabolic syndrome. *Mol. Biol. Rep.* **39**, 6555-6561.
- Zimmet, P., Alberti, K. G., Kaufman, F., Tajima, N., Silink, M., Arslanian, S., Wong, G., Bennett, P., Shaw, J., Caprio, S. (2007) The metabolic syndrome in children and adolescents – an IDF consensus report. *Pediatr. Diabetes* **8**, 299-306.
- Zobel, D. P., Andreassen, C. H., Grarup, N., Eiberg, H., Sorensen, T. I., Sandback, A., Lauritzen, T., Borch-Johnsen, K., Jorgensen, T., Pedersen, O., Hansen, T. (2009) Variants near MC4R are associated with obesity and influence obesity-related quantitative traits in a population of middle-aged people: studies of 14,940 Danes. *Diabetes* **58**, 757-764.
- Zuccato, C., Ciammola, A., Rigamonti, D., Leavitt, B. R., Goffredo, D., Conti, L., MacDonald, M. E., Friedlander, R. M., Silani, V., Hayden, M. R., Timmusk, T., Sipione, S., Cattaneo, E. (2001) Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* **293**, 493-498.

4.2 Glukózová homeostáza a inzulinová rezistence: prevalence, pohlavní rozdíly a prediktory u adolescentů

Autoři: Aldhoon-Hainerová I., Zamrazilová H., Dušátková L., Sedláčková B., Hlavatý P., Hill M., Hampl R., Kunešová M., Hainer V.

Diabetology & Metabolic Syndrome 2014; 6(1):100. IF = 2,173

Abstrakt: Dospívání je spojeno s vyšším rizikem poruch glukózového metabolismu v důsledku tranzientní pubertální inzulinové rezistence. Tato studie si dala za cíle zjistit prevalenci porušeného glukózového metabolismu, definovat pohlavně specifické hodnoty homeostatického modelu inzulinové rezistence (HOMA-IR), které jsou již spojené se zvýšeným kardiometabolickým rizikem a určit prediktory HOMA-IR u české dospívající populace (615 jedinců s normální hmotností, 230 s nadváhou a 683 s obezitou). Prevalence porušené lačné glykemie byla 7 % a T2DM < 0,5 %. Prevalence porušené lačné glykemie byla vyšší u chlapců než u dívek bez ohledu na tělesnou hmotnost. Inzulinová rezistence byla také častěji nalezena u obézních chlapců než u obézních dívek. Hranice HOMA-IR asociovaná s kardiometabolickými riziky byla stanovena na 4,4 u chlapců a 3,6 u dívek. Jako významné prediktory HOMA-IR se ukázaly být věk, BMI, poměr trijódtyronin/volný tyroxin, gamma-glutamyltransferáza a hladiny triacylglycerolů a globulinu vázající pohlavní hormony. Studie tedy prokázala, že prevalence T2DM je u adolescentů (i těch obézních) velmi nízká. Obézní chlapci mají vyšší riziko inzulinové rezistence a výskytu pre-diabetu než obézní dívky. Hranice HOMA-IR spojené s kardiometabolickými riziky jsou pohlavně specifické, na rozdíl od prediktorů HOMA-IR, které jsou stejné pro obě pohlaví.

U této práce jsem se podílela na sběru a analýze dat a revizi manuskriptu.

RESEARCH

Open Access

Glucose homeostasis and insulin resistance: prevalence, gender differences and predictors in adolescents

Irena Aldhoon-Hainerová^{1,2*}, Hana Zamrazilová^{1†}, Lenka Dušátková^{1,3}, Barbora Sedláčková^{1,3}, Petr Hlavatý¹, Martin Hill¹, Richard Hampl¹, Marie Kunešová¹ and Vojtěch Hainer¹

Abstract

Background: Adolescence, due to transient pubertal insulin resistance (IR), is associated with a higher risk for disturbances of glucose metabolism. The aim of our study was 1) to investigate the prevalence of disturbances of glucose metabolism, 2) to define gender specific homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) thresholds associated with increased cardiometabolic risks and 3) to provide predictors of HOMA-IR.

Methods: The studied cohort consisted of Czech adolescents aged 13.0-17.9 years: 1,518 individuals of general population and three studied groups according weight category (615 normal weight, 230 overweight and 683 obese). The prevalence of IR, impaired fasting glucose (IFG) and type 2 diabetes was assessed. Risky HOMA-IR thresholds based on components of metabolic syndrome were investigated. HOMA-IR prediction was calculated taking into account age, blood pressure, multiple anthropometric, biochemical and hormonal parameters.

Results: In general population cohort, the prevalence of IFG and type 2 diabetes was 7.0% and <0.5%, respectively. Boys regardless of weight presented significantly higher levels of blood glucose and higher prevalence of IFG than girls. Obese boys were found more insulin resistant than obese girls. HOMA-IR thresholds of 3.6 for girls and 4.4 for boys were associated with increased cardiometabolic risks. For both genders, the model of HOMA-IR prediction was composed of age, BMI, ratio of free triiodothyronine to free thyroxine, gamma-glutamyltransferase activity and levels of triglycerides and sex hormone-binding globulin.

Conclusions: The type 2 diabetes in adolescents, including those who were obese, was rarely diagnosed. Obese adolescent boys were at greater risk for IR and for IFG than obese girls. In adolescence, thresholds of HOMA-IR in contrast to predictors were found gender specific.

Keywords: Adolescence, Glucose homeostasis, HOMA-IR prediction, Insulin resistance, Metabolic syndrome, Obesity, Type 2 diabetes

Introduction

Insulin resistance (IR) together with an impaired insulin secretion does play a role in the pathogenesis of type 2 diabetes [1]. A degree of IR is influenced by age, gender, race and ethnicity, a stage of sexual development, total adiposity and fat distribution [2-4]. To date, there is

no universally accepted pediatric definition for IR. The homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) is simple method to measure IR [5] and even in obese children strongly correlates with the results derived from clamp studies [6]. An identification of insulin resistant adolescent is highly important as the occurrence of type 2 diabetes coincides with the peak of pubertal IR [7]. The interpretation of HOMA-IR value is particularly challenging at adolescence. Several HOMA-IR thresholds to define IR in adolescence have been suggested [8-11].

* Correspondence: ihainer@hotmail.com

†Equal contributors

¹Institute of Endocrinology, Obesity Management Center, Národní 8, 116 94 Prague 1, Czech Republic

²Department of Pediatrics and Center for Research of Diabetes, Metabolism and Nutrition, Third Faculty of Medicine, Charles University, Šrobárova 50, 100 34 Prague 10, Czech Republic

Full list of author information is available at the end of the article



Fasting insulin level is sometimes used as a marker of IR. A study of Moran et al. demonstrated a significant correlation between glucose uptake during insulin clamp and fasting insulin levels [4]. IR, particularly in girls, has been shown to be associated with a decreased ratio of C-peptide to insulin [12].

Patients with impaired fasting glucose (IFG) are referred to as having prediabetes and they are considered at risk for future development of type 2 diabetes [13]. Data from National Health and Nutrition Examination Survey showed that the prevalence of IFG in United States (US) adolescents was 7.0% [14]. Higher prevalence of IFG is usually found in obese adolescents than in normal weight counterparts [14]. The prevalence of type 2 diabetes in children varies across the world but an increasing trend due to obesity epidemic is observed. A higher prevalence of type 2 diabetes is found in the US children mainly in those of non-White European descent [15]. In the Northern and Central Europe type 2 diabetes is still, even in obese children, rarely diagnosed and its prevalence ranges 0.5 to 1.5% [16-18].

Metabolic syndrome due to IR predisposes affected individuals to type 2 diabetes. Tresaco et al. showed that HOMA-IR is a useful tool to detect children and adolescents with this condition [8]. Several studies investigated predictors of pubertal IR e.g. anthropometric parameters [19], body composition [20], adipokines [20-22] and several hormones [23,24].

The first aim of our study was to reveal the prevalence of IR, IFG and type 2 diabetes in normal weight, overweight and obese Czech adolescents, and in a general population cohort. Second, we aimed to investigate the effects of gender and weight status on levels of blood glucose, insulin, C-peptide, C-peptide to insulin ratio and HOMA-IR. Our third aim was to examine the level of HOMA-IR in relation to the presence of parameters defining metabolic syndrome. Finally, we intended to assess major predictors of HOMA-IR from the whole cohort of studied Czech adolescents.

Methods

Study population

The cohort for the present study was constituted of Czech adolescents aged 13.0-17.9 years from the Childhood Obesity Prevalence And Treatment project which consists of a general population cohort (all body weight categories) and of in- and out-patient weight intervention cohort (overweight and obese individuals only). Analyses were performed in 1,518 Czech adolescents of general population (775 girls, 743 boys; 23.9% of girls and 29.3% of boys were either overweight or obese) and in three weight categories: 615 normal weight (322 girls and 293 boys) for Body Mass Index (BMI) 25.-75. percentile (derived from the general population cohort only), 230

overweight (116 girls, 114 boys) for BMI 90.-97. percentile and 683 obese (381 girls, 302 boys) for BMI \geq 97. percentile for sex and age of the Czech reference [25]. The overweight and obese groups were constituted from both the general population cohort and from the intervention study of the above mentioned project. A detailed design of the project has already been described [26].

Ethics statement

The study protocol was approved by the Ethical Committee of the Institute of Endocrinology in Prague and was in accordance with the Helsinki declaration II. All participants and their parent(s)/guardian(s) signed an informed consent before the initiation of study procedures.

Clinical examination, anthropometry and body composition

Following parameters were investigated: age; systolic and diastolic blood pressure; anthropometric parameters and indexes (weight, height, waist circumference, abdominal circumference, hip circumference, arm circumference and their z scores; sagittal abdominal diameter; skinfolds: suprailiac, biceps, triceps, abdomen and subscapular; fat assessed by bioimpedance (Tanita BC-418 MA, Tanita AB 140 MA Viscan, Tanita Corporation, Tokyo, Japan): trunk fat, total body fat, and visceral fat; indexes: BMI, BMI z-score, waist-to-hip ratio, waist-to-height ratio, body adiposity index: [(hip circumference)/((height) 1.5) - 18, a body shape index: waist circumference divided by BMI^{2/3} height^{1/2}].

Biochemical and hormonal parameters

We investigated following biochemical parameters: blood glucose, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, triglyceride (TG), C-peptide, C-reactive protein, uric acid, activity of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and gamma-glutamyl aminotransferase (GGT) and the following hormonal parameters: insulin, free triiodothyronine (fT3), free thyroxine (fT4), thyroid stimulating hormone, prolactin, cortisol, dehydroepiandrosterone sulfate, sex hormone-binding globulin (SHBG), testosterone, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, estradiol, progesterone, adiponectin, adipisin, ghrelin, glucose insulinotropic peptide, glucagon-like-peptide 1, glucagon, leptin, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), resistin and visfatin. Ratio of fT3 to fT4 was calculated.

Anthropometric procedures, laboratory assays and evaluations have been described in a previously published paper [26].

Definitions of glucose homeostasis disturbances, IR and metabolic syndrome

According to the American Diabetes Association IFG is defined by fasting blood glucose 5.6–6.9 mmol/l and type 2 diabetes by fasting blood glucose \geq 7.0 mmol/l [13]. IR was evaluated by the HOMA-IR that was calculated by the following formula: fasting plasma insulin (microunits per liter) \times fasting glucose (millimoles per liter)/22.5 [5]. In order to estimate IR in our cohorts, we used the thresholds of HOMA-IR $>$ 2.5 and $>$ 4.0 [5,27]. HOMA-IR \leq 4.0 was shown to be associated with a little probability of type 2 diabetes development [28]. Parameters of the International Diabetes Federation (IDF) definition of the metabolic syndrome were used in our analyses [29].

Statistical analyses

To eliminate skewed data distribution and heteroscedasticity, the original data were transformed to a Gaussian distribution by a Box-Cox transformation before further processing using the statistical software Statgraphics Centurion, version XV from Statpoint Inc. (Herndon, Virginia, USA). Data were analyzed using non-parametric tests: Mann-Whitney test (for differences between two independent groups) and Kruskal-Wallis multiple comparisons (for differences among three or more independent groups). Categorical data were tested by Chi-square test. The statistical software NCSS 2004 (Kaysville, Utah, 190 USA) were used. P-value (two-tailed) $<$ 0.05 was considered statistically significant.

In order to detect relationships between HOMA-IR and studied parameters we applied a multivariate regression with reduction of dimensionality, known as OPLS [30]. All subjects that had been assessed for the present study were used for the prediction of HOMA-IR. Analyses were performed separately for boys and girls. OPLS allowed us to find a model predicting HOMA-IR based both on the minimum number of widely available parameters but also on the best predictability. We tested the relevance of individual variables for the model using a criterion variable importance. At the first stage, all above mentioned parameters, excluding levels of blood glucose and insulin, were studied for HOMA-IR prediction. We constructed two models for HOMA-IR prediction. The first model comprised components with the highest predictability. The second model was based on the first model and aimed at components that are widely available in clinical practice (clinical model).

The statistical software SIMCA-P + Version 12.0.0.0 from Umetrics AB (Umeå, Sweden) was used for data analyses. The software enabled us to find the number of the relevant components utilizing the prediction error sum of squares and also allowed the detection of multivariate non-homogeneities and testing the multivariate normal distribution and homoscedasticity.

Results

Disturbances of glucose metabolism and IR

Basic characteristics and only those parameters, which were found as major predictors of HOMA-IR, for all studied groups are presented in Table 1. Between girls and boys of each studied group, there were no differences in age and BMI z-score except for BMI z-score in the overweight cohort (Table 1). Table 1 also shows the prevalence of IFG, type 2 diabetes and of IR defined by two thresholds of HOMA-IR in each cohort. IFG was more common in boys than in girls regardless of weight status (Table 1).

Significant differences in BMI z-scores, levels of insulin, C-peptide, C-peptide to insulin ratio (except for the ratio in overweight vs. obese girls) and HOMA-IR ($p = 0.000$) but not in blood glucose level were found when weight categories were compared between each other (normal weight vs. overweight; normal weight vs. obese; overweight vs. obese) in analyses within each gender (data not shown). In all cohorts, boys presented significantly greater level of blood glucose than girls ($p = 0.000$) (Table 1). Levels of insulin and C-peptide were significantly higher in girls than in boys in the normal weight and in the general population cohorts ($p = 0.001$) (Table 1). However, obese boys had significantly higher insulin, C-peptide and HOMA-IR than obese girls (Table 1). C-peptide to insulin ratio gradually decreased with an increasing body weight. No gender differences in this ratio were noted except for obese individuals (Table 1).

HOMA-IR thresholds associated with cardiometabolic risks

In both genders, HOMA-IR gradually increased with increasing number of parameters derived from metabolic syndrome definition. HOMA-IR of 3.6 for girls and of 4.4 for boys were identified as cut-off values that corresponded to increased cardiometabolic risks defined as a presence of three components of metabolic syndrome (Table 2). These HOMA-IR values represent the 84.0 and 87.0 percentile in girls and boys of general population, respectively.

HOMA-IR prediction

Out of 68 analyzed parameters, 57 parameters in boys (43.2% variability of the dependent variable explained by OPLS method) and 51 parameters in girls (30.1% variability of the dependent variable explained by OPLS method) showed a significance to HOMA-IR prediction. At this stage, we first selected those parameters that presented with the highest prediction and were more or less shared by both genders. Similar prediction of most of the studied anthropometric parameters were found, thus, for the further model analyses we only included BMI. In the predictive model, age, BMI, ratio of fT3 to fT4, GMT activity, levels of TG, SHBG, leptin, PAI-1, ghrelin, adiponectin and testosterone explained 41.4% of the HOMA-IR in boys. Except for the level of testosterone, girls presented with the

Table 1 Baseline characteristics of studied cohorts – general population, normal weight, overweight and obese

| Parameter | General population | | | Normal weight | | | Overweight | | | Obese | | |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------|
| | Girls (n = 775) | Boys (n = 743) | P | Girls (n = 322) | Boys (n = 293) | P | Girls (n = 116) | Boys (n = 114) | P | Girls (n = 381) | Boys (n = 302) | P |
| Age* (years) | 16.02 (15.10;17.00) | 16.08 (15.13;17.00) | 0.745 | 16.12 (15.16;17.02) | 15.87 (15.08;16.84) | 0.097 | 15.66 (14.82;16.92) | 16.04 (14.46;17.08) | 0.465 | 15.18 (14.07;16.42) | 15.21 (14.03;16.56) | 0.990 |
| BMI* (kg/m ²) | 21.25 (19.41;23.61) | 21.47 (19.64;24.48) | 0.022 | 20.28 (19.58;21.15) | 20.29 (19.58;21.08) | 0.963 | 24.79 (24.17;25.48) | 24.75 (24.08;25.70) | 0.934 | 29.95 (27.89;33.07) | 30.34 (28.13;33.95) | 0.146 |
| BMI* z-score | 0.24 (-0.46;1.15) | 0.22 (-0.39;1.25) | 0.280 | -0.12 (-0.41;0.19) | -0.15 (-0.39;0.10) | 0.114 | 1.60 (1.39;1.60) | 1.43 (1.22;1.66) | 0.000 | 3.53 (2.78;4.65) | 3.50 (2.69;4.72) | 0.506 |
| FBG* (mmol/l) | 4.83 (4.55;5.09) | 5.09 (4.84;5.35) | 0.000 | 4.79 (4.52;5.06) | 5.08 (4.82;5.31) | 0.000 | 4.79 (4.52;5.07) | 5.13 (4.90;5.43) | 0.000 | 4.82 (4.52;5.14) | 5.08 (4.81;5.34) | 0.000 |
| Insulin* (mIU/l) | 10.57 (7.91;14.08) | 9.78 (7.25;13.70) | 0.010 | 9.80 (7.6;12.17) | 8.4 (6.42;11.61) | 0.001 | 11.84 (9.24;15.16) | 11.30 (8.85;15.29) | 0.626 | 13.93 (9.72;19.84) | 15.98 (11.22;24.83) | 0.001 |
| C-peptide* (nmol/l) | 0.75 (0.63;0.89) | 0.69 (0.57;0.86) | 0.000 | 0.71 (0.60;0.82) | 0.64 (0.53;0.77) | 0.000 | 0.79 (0.68;0.91) | 0.78 (0.65;0.92) | 0.723 | 0.92 (0.74;1.13) | 0.94 (0.77;1.23) | 0.040 |
| HOMA-IR* | 2.26 (1.66;3.11) | 2.23 (1.63;3.20) | 0.681 | 2.09 (1.54;2.72) | 1.89 (1.43;2.71) | 0.099 | 2.52 (1.92;3.32) | 2.65 (1.91;3.65) | 0.360 | 2.95 (2.10;4.29) | 3.56 (2.51;5.74) | 0.000 |
| C-peptide/Insulin* | 10.09 (8.37;11.93) | 9.96 (8.48;12.09) | 0.543 | 10.39 (9.15;12.13) | 10.47 (8.97;12.41) | 0.728 | 9.50 (8.16;11.13) | 9.52 (7.99;11.24) | 0.814 | 9.21 (7.73;11.15) | 8.54 (6.98;10.08) | 0.000 |
| TG* (mmol/l) | 0.87 (0.67;1.18) | 0.82 (0.63;1.08) | 0.002 | 0.83 (0.65;1.19) | 0.74 (0.58;0.92) | 0.000 | 0.90 (0.66;1.18) | 0.94 (0.66;1.23) | 0.714 | 0.96 (0.74;1.38) | 1.12 (0.82;1.64) | 0.000 |
| GM-T* (µkat/l) | 0.20 (0.17;0.25) | 0.26 (0.22;0.337) | 0.000 | 0.19 (0.16;0.24) | 0.25 (0.21;0.30) | 0.000 | 0.22 (0.18;0.30) | 0.30 (0.25;0.42) | 0.000 | 0.25 (0.2;0.32) | 0.34 (0.27;0.51) | 0.000 |
| FT3/FT4* | 0.35 (0.32;0.40) | 0.39 (0.35;0.44) | 0.000 | 0.35 (0.32;0.40) | 0.39 (0.35;0.44) | 0.000 | 0.36 (0.32;0.39) | 0.40 (0.36;0.46) | 0.000 | 0.35 (0.31;0.40) | 0.40 (0.36;0.46) | 0.000 |
| SHBG* (nmol/l) | 57.77 (37.35;82.62) | 31.63 (23.15;43.80) | 0.000 | 63.04 (45.26;89.82) | 35.45 (25.94;48.58) | 0.000 | 44.50 (27.99;71.62) | 29.49 (21.76;43.38) | 0.000 | 31.90 (22.59;45.54) | 22.62 (15.76;43.78) | 0.000 |
| Testosterone* (nmol/l) | 0.30 (0.22;0.40) | 0.525 (4.02;6.73) | 0.000 | 0.30 (0.22;0.41) | 5.97 (4.72;7.10) | 0.000 | 0.31 (0.23;0.43) | 4.60 (3.32;6.41) | 0.000 | 0.36 (0.26;0.48) | 2.96 (1.75;4.34) | 0.000 |
| Adiponectin* (ng/l) | 782 (5.36;10.56) | 6.00 (4.55;8.17) | 0.000 | 8.61 (6.09;11.04) | 6.59 (5.05;8.43) | 0.000 | 6.34 (4.86;8.98) | 5.28 (4.00;7.42) | 0.001 | 5.58 (3.96;7.81) | 4.52 (3.30;6.00) | 0.000 |
| Ghrelin* (pg/ml) | 669.11 (503.72;899.49) | 600.59 (459.78;829.32) | 0.000 | 688.97 (507.15;918.92) | 597.65 (460.22;869.06) | 0.006 | 646.55 (520.87;862.62) | 580.91 (480.43;783.88) | 0.138 | 582.61 (445.71;759.52) | 543.17 (406.74;686.29) | 0.012 |
| Leptin* (ng/ml) | 4.81 (3.07;7.29) | 0.89 (0.51;2.18) | 0.000 | 4.02 (2.81;5.81) | 0.63 (0.41;0.89) | 0.000 | 7.25 (5.27;9.96) | 2.16 (1.21;3.20) | 0.000 | 9.41 (6.20;14.69) | 5.48 (3.28;8.32) | 0.000 |
| PAI-1* (ng/ml) | 2.97 (2.04;3.94) | 3.03 (2.35;4.10) | 0.002 | 2.64 (1.89;3.43) | 2.79 (2.21;3.57) | 0.033 | 3.46 (2.45;4.70) | 3.37 (2.74;4.45) | 0.842 | 4.40 (3.19;6.19) | 4.87 (3.53;6.76) | 0.013 |
| HOMA-IR > 2.5 (n,%) | 314 (40.50%) | 304 (40.90%) | 0.874 [†] | 98 (30.40%) | 82 (28.00%) | 0.505 [†] | 58 (50.00%) | 59 (51.80%) | 0.790 [†] | 251 (65.90%) | 228 (75.50%) | 0.006 [†] |
| HOMA-IR > 4 (n,%) | 84 (10.80%) | 106 (14.30%) | 0.044 [†] | 15 (4.70%) | 21 (7.20%) | 0.186 [†] | 13 (11.20%) | 20 (17.50%) | 0.170 [†] | 111 (29.10%) | 133 (44.00%) | 0.000 [†] |
| IFG (n,%) | 34 (4.40%) | 72 (9.70%) | 0.000 [†] | 12 (3.70%) | 20 (6.80%) | 0.084 [†] | 2 (1.70%) | 15 (13.20%) | 0.001 [†] | 22 (5.80%) | 29 (9.60%) | 0.060 [†] |
| T2DM (n,%) | 1 (0.13%) | 2 (0.27) | ± | 0 | 0 | --- | 0 | 0 | --- | 2 (0.50%) | 1 (0.30%) | ± |

BMI, body mass index; T2DM, type 2 diabetes; FBG, fasting blood glucose; FT3/FT4, ratio of free triiodothyronine to free thyroxine; GMT, gamma-glutamyltransferase; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; IFG, impaired fasting glucose; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; TG, triglycerides. [†]Data are described as median, lower and upper quartiles. [‡]Chi-test was used. [†]Not calculated due to small number of probands. Data significant at p < 0.05.

Table 2 HOMA-IR values in relation to the number of metabolic syndrome components

| Number of metabolic syndrome components (number of girls/boys) | HOMA-IR | |
|----------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------|
| | Girls | Boys |
| 0 (468/301 girls/boys) | 2.12 (1.53; 2.84) | 1.90 (1.42; 2.61) |
| 1 (381/359 girls/boys) | 2.55 (1.80; 3.45) | 2.28 (1.65; 3.11) |
| 2 (174/168 girls/boys) | 2.85 (2.09; 4.37) | 3.19 (2.20; 5.03) |
| 3 (54/76 girls/boys) | 3.60 (2.56; 5.69) | 4.44 (2.88; 6.25) |
| 4 (4/29 girls/boys) | 5.86 (4.90; 9.19) | 6.38 (4.26; 7.98) |
| 5 (0/3 girls/boys) | --- | 7.19 (4.33; 13.93) |

HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance. Data are described as median, lower and upper quartiles.

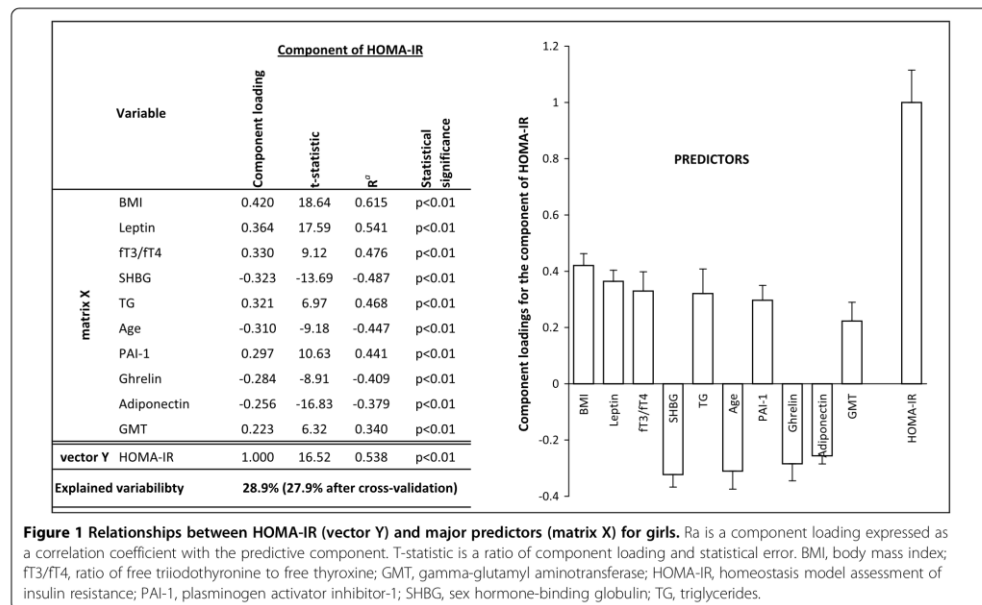
same predictors but the HOMA-IR variability was explained by 28.9% (Figures 1 and 2). Construction of the second predictive model was based on inclusion of the minimum of widely used parameters in clinical practice such as age, BMI, ratio of FT3 to FT4, GMT activity, levels of TG and SHBG. The model showed still satisfactory predictability (37.8% variability of the dependent variable explained by OPLS method in boys, resp. 20.5% in girls).

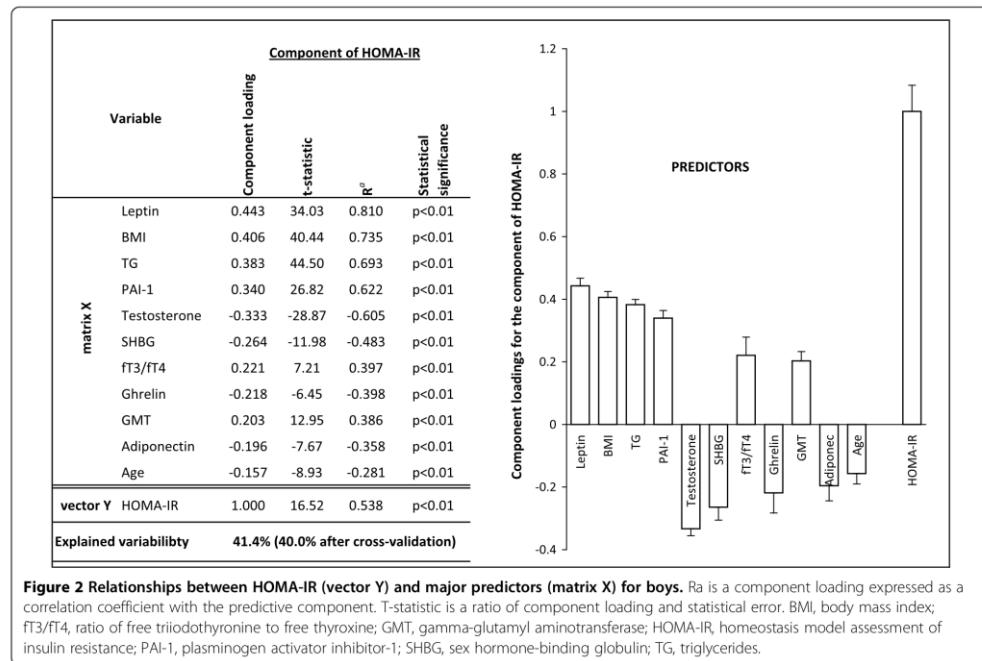
Discussion

Disturbances of glucose metabolism and IR

Our study of Czech adolescents presents an overview of glucose metabolism with respect to different weight categories and to gender. To date, there are no data on

glucose homeostasis disturbances in Czech adolescents. In the representative cohort of Czech adolescents, IFG was found in 7.0% with a higher prevalence in boys than in girls (9.7 vs. 4.4%). This finding is in accordance with US data which showed similar overall prevalence of IFG in adolescents and also higher prevalence in boys than in girls (10.0% vs. 4.0%) [14]. We further showed that boys are at greater risk for IFG regardless weight status. Our results of an overall prevalence of type 2 diabetes in general population (0.2%) and obese adolescents (0.4%) indicate that type 2 diabetes is still a rare diagnosis even in the population of obese Czech adolescents. It is known that the prevalence varies by ethnicity and that much greater prevalence of type 2 diabetes is found in the US non-White European descent [15]. Lower prevalence of type 2 diabetes may partly be explained by ethnically homogenous Czech Caucasian population. In contrast to results from US it has been demonstrated that type 2 diabetes in the Northern and Central Europe is still rarely diagnosed even in obese children [16]. It is highly interesting that the level of fasting blood glucose was similar across weight categories but always significantly higher in boys than in girls. Brandou et al. found that the level of blood glucose was significantly higher in obese than in normal weight children but only in prepubertal period [31]. Several studies concluded that men had tendency towards higher prevalence of abnormalities of glucose homeostasis than women [32,33]. A recent study performed on Chinese





children and adolescents has also reported significantly higher levels of fasting blood glucose in boys in comparison to girls regardless of weight status [20]. Our results as conclusions of others indicate that the HOMA-IR cut-off point of 2.5 is not suitable for adolescence [9]. Interestingly, only in the obese group there was a significant gender difference in the prevalence of IR. This result emphasizes the fact that obese adolescent boys are at greater risk for IR than girls of comparable degree of obesity.

It has already been demonstrated by several investigators that gender has an effect on insulin sensitivity [1,3,4,9,34]. In normal weight Czech adolescents as well as in the general population cohort, levels of insulin and C-peptide were found significantly higher in girls than in boys. This finding would therefore confirm the fact that at puberty girls tend to be more insulin resistant than boys. Several studies showed a higher IR in girls than in boys even after adjustment for weight status, several anthropometric parameters, race and ethnicity [1,4]. According to our results, obesity in males led to a significantly higher levels of insulin, C-peptide, HOMA-IR and lower C-peptide to insulin ratio than in obese girls. This is in line with conclusion of Kurtoglu et al. who demonstrated that HOMA-IR cut-off values in the pubertal stage were significantly higher in boys than in girls [10].

HOMA-IR thresholds associated with cardiometabolic risks
 HOMA-IR was shown to be a useful tool to detect children and adolescents with metabolic syndrome [8]. As expected and in accordance with the study of Chinese children and teenagers we confirmed the trend of increasing HOMA-IR values with the increasing number of metabolic syndrome components [35]. At adolescence, HOMA-IR thresholds of 3.6 for girls and 4.4 for boys were associated with increased cardiometabolic risks. In the agreement with the conclusion of Kurtoglu et al., we also emphasize the necessity of gender specific cut-off thresholds [10].

HOMA-IR prediction

According to our findings, a broad variety of parameters had a predictive power for HOMA-IR. As expected the majority of studied anthropometric parameters played a role in the index prediction. Due to the fact that the prediction rate among anthropometric parameters was similar, only BMI was included for further model assessment. BMI is widely used in clinical practice, in epidemiological studies and according to our findings had a comparable prediction to other anthropometric parameters, e.g. waist circumference. A study by Bosy-Westphal et al. concluded that waist circumference and BMI have an equivalent

value for obesity-related metabolic risk assessment [36]. The same study also showed that measurement of body fat mass has no advantage over BMI and waist circumference in the prediction of obesity-related metabolic risk [36]. We are aware of the fact that in normal weight but insulin resistant subjects other factors than BMI probably play a role in the development of IR, e.g. fat distribution, family history. According to our predictive models, age in girls seemed to be stronger predictor of HOMA-IR than in boys. Younger age particularly in girls was associated with higher HOMA-IR. This is probably due to the fact that younger girls of our cohort were at the peak of IR associated with puberty.

In our cohort, GMT activity and levels of TG, SHBG, leptin, PAI-1, ghrelin and adiponectin in both genders and testosterone in boys were revealed as key components in HOMA-IR prediction. A strong correlation between IR and TG has already been confirmed by several studies [37]. Significant associations between IR and non-alcoholic fatty liver disease as well as similar risk and protective factors for these two inter-related disorders are known [38,39]. It is well recognized that GMT activity is a marker of oxidative stress and is associated with an increased risk of cardiovascular disease and components of metabolic syndrome [40].

According to our results, testosterone was associated with HOMA-IR prediction in boys. Testosterone is usually decreased in obese males than in their lean counterparts. It has also been shown that glucose disposal was significantly associated with serum testosterone, even after controlling for BMI and Tanner stage and thus, linking the presence of IR with hypogonadism [41]. The level of SHBG was found as an important predictor of IR in both genders. A strong correlation between level of leptin and IR measured by HOMA-IR even after adjustment for gender and BMI has previously been shown [42]. In a recently published study, leptin was also found as a strong and independent predictor of HOMA-IR in boys and in girls [20]. However, some authors indicated this relationship due to increased fat mass [43]. PAI-1 represents an independent risk factor for cardiovascular diseases and its level and activity is increased in type 2 diabetics [44]. A study on young adults demonstrated that PAI-1 concentrations were higher in subjects with impaired glucose tolerance than in subjects with normal glucose tolerance even having comparable age, BMI, waist circumference and fat mass [44]. In relation to HOMA-IR, ghrelin was another parameter with a predictive power in Czech girls and boys. Bacha et al. suggested that ghrelin suppression might be another feature of IR in overweight adolescents [23]. A correlation of adiponectin with IR has already been demonstrated [21,22].

In the analyses, in which all studied parameters had been taken into account, TSH in both genders, fT4 in

boys and fT3 in girls were found to have some predictive power for HOMA-IR. However, the ratio of fT3 to fT4 had stronger prediction than the above mentioned parameters, thus we included this ratio in the predictive models. Several studies demonstrated that a higher fT3 to fT4 ratio is associated with various markers of unfavorable metabolic profile and cardiovascular risk [45].

The existence of such a difference in prediction variability between boys and girls is rather interesting. Boys presented with higher prediction in all models regardless number of components. We assume that this might be due to the major influence of increased insulin level in girls as the consequence of pubertal physiological IR.

The major limitation of our study is the lack of data on the presence of acanthosis nigricans as the clinical sign of IR and the lack of the assessment of pubertal status in our adolescents. According to a unique longitudinal study performed in our country in years 1961–1982, the average age of pubertal maturity was 15.5–16.0 years in boys and 13.0 years in girls [46]. We thus assume that probably all of the girls and the majority of boys of our cohort have entered puberty at the time of investigation.

Conclusions

In conclusion, type 2 diabetes in Czech adolescents even in obese individuals was rarely diagnosed. Findings of significantly higher level of blood glucose and higher prevalence of IFG regardless of weight status in boys than in girls lead us to a conclusion that adolescent boys in general are at greater risk of glucose disturbances in comparison to adolescent girls. This is further supported by our results that showed obese boys more insulin resistant than obese girls. In adolescence, HOMA-IR of 3.6 for girls and of 4.4 for boys were identified as cut-off values that corresponded to increased cardiometabolic risks. Several parameters seemed to play a role in HOMA-IR prediction. Major predictors for both genders were age, BMI, ratio of fT3 to fT4, GMT activity and levels of TG and SHBG.

Abbreviations

BMI: Body mass index; FBG: Fasting blood glucose; fT3: Free triiodothyronine; fT4: Free thyroxine; GMT: Gamma-glutamyltransferase; HOMA-IR: Homeostasis model assessment of insulin resistance; IFG: Impaired fasting glucose; IR: Insulin resistance; OPLS: Orthogonal projections to latent structures; PAI-1: Plasminogen activator inhibitor-1; SHBG: Sex hormone-binding globulin; TG: Triglyceride; T2DM: Type 2 diabetes; US: United States.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

IAH and HZ researched data and designed the study. IAH wrote the manuscript. HZ and MH performed statistical analyses and prepared all the tables and figures. VH and MK reviewed the manuscript and contributed to discussion. LD, BS and RH performed all laboratory investigations. PH was responsible for clinical examination of the studied individuals. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This study was supported by grants: NT/13792-4 Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic (funding of study design and manuscript submission, funding of LD, BS, MH, MK and VH), NT/12342-5/2011 Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic (funding of biochemical analyses, funding of PH), CZ0123 from Norway through the Norwegian Financial Mechanisms (funding of cohort collection, clinical examination, biochemical analyses, funding of RH) and PRVOUK P31 (funding of statistical analyses and data interpretation, funding of IAH and HZ). We would like to thank the study participants and their families, participating pediatricians and weight management centers.

Author details

¹Institute of Endocrinology, Obesity Management Center, Národní 8, 116 94 Prague 1, Czech Republic. ²Department of Pediatrics and Center for Research of Diabetes, Metabolism and Nutrition, Third Faculty of Medicine, Charles University, Šrobárova 50, 100 34 Prague 10, Czech Republic. ³Faculty of Science, Charles University, Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic.

Received: 8 June 2014 Accepted: 16 August 2014
Published: 16 September 2014

References

1. Lee JM, Okumura MJ, Davis MM, Herman WH, Gurney JG: **Prevalence and determinants of insulin resistance among U.S. adolescents: a population-based study.** *Diabetes Care* 2006, **29**:2427-2432.
2. Caprio S, Cline G, Boulware S, Permenter C, Shulman GI, Sherwin RS, Tamborlane WV: **Effects of puberty and diabetes on metabolism of insulin-sensitive fuels.** *Am J Physiol* 1994, **266**:E885-E891.
3. Travers SH, Jeffers BW, Bloch CA, Hill JO, Eckel RH: **Gender and Tanner stage differences in body composition and insulin sensitivity in early pubertal children.** *J Clin Endocrinol Metab* 1995, **80**:172-178.
4. Moran A, Jacobs DR Jr, Steinberger J, Hong C-P, Prineas R, Luepker RV, Sinaiko AR: **Insulin resistance during puberty: results from clamp studies in 357 children.** *Diabetes* 1999, **48**:2039-2044.
5. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC: **Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man.** *Diabetologia* 1985, **28**:412-419.
6. Conwell LS, Trost SG, Brown WJ, Batch JA: **Indexes of insulin resistance and secretion in obese children and adolescents: a validation study.** *Diabetes Care* 2004, **27**:314-319.
7. Haymond MW: **Measuring insulin resistance: a task worth doing: but how?** *Pediatr Diabetes* 2003, **4**:115-118.
8. Tresaco B, Bueno G, Pineda I, Moreno LA, Garagorri JM, Bueno M: **Homeostatic model assessment (HOMA) index cut off values to identify the metabolic syndrome in children.** *J Physiol Biochem* 2005, **61**:381-388.
9. Keskin M, Kurtoglu S, Kendirci M, Atabek ME, Yazici C: **Homeostasis model assessment is more reliable than the fasting glucose/insulin ratio and quantitative insulin sensitivity check index for assessing insulin resistance among obese children and adolescents.** *Pediatrics* 2005, **115**:e500-e503.
10. Kurtoglu S, Hatipoğlu N, Mazicioğlu M, Kendirci M, Keskin M, Kondolot M: **Insulin resistance in obese children and adolescents: HOMA-IR cut-off levels in the prepubertal and pubertal periods.** *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2010, **2**:100-106.
11. Rodden AM, Diaz VA, Mainous AG 3rd, Koopman RJ, Geesey ME: **Insulin resistance in adolescents.** *J Pediatr* 2007, **151**:275-279.
12. Jiang X, Srinivasan SR, Radhakrishnamurthy B, Dallferes ER, Berenson GS: **Racial (black-white) differences in insulin secretion and clearance in adolescents: The Bogalusa Heart Study.** *Pediatrics* 1996, **97**:357-360.
13. American Diabetes Association: **Standards of medical care in diabetes-2010.** *Diabetes Care* 2010, **33**(Suppl 1):S11-S61.
14. Williams DE, Cadwell BL, Cheng YJ, Cowie CC, Gregg EW, Geiss LS, Engelgau MM, Narayan KM, Imperatore G: **Prevalence of impaired fasting glucose and its relationship with cardiovascular disease risk factors in US adolescents, 1999-2000.** *Pediatrics* 2005, **116**:1122-1126.
15. Writing Group for the SEARCH for Diabetes in Youth Study Group, Dabelea D, Bell RA, D'Agostino RB Jr, Imperatore G, Johansen JM, Linder B, Liu LL, Loots B, Marcovina S, Mayer-Davis EJ, Pettitt DJ, Waletzky B: **Incidence of diabetes in youth in the United States.** *JAMA* 2007, **297**:2716-2724.
16. Wiegand S, Maikowski U, Blankenstein O, Biebermann H, Tarnow P, Grüters A: **Type 2 diabetes and impaired glucose tolerance in European children and adolescents with obesity - a problem that is no longer restricted to minority groups.** *Eur J Endocrinol* 2004, **151**:199-206.
17. Mazur A, Grzywa M, Malecka-Tendera E, Telega G: **Prevalence of glucose intolerance in school age children. Population based cross-sectional study.** *Acta Paediatr* 2007, **96**:1799-1802.
18. Malecka-Tendera E, Erhardt E, Molnár D: **Type 2 diabetes mellitus in European children and adolescents.** *Acta Paediatr* 2005, **94**:543-546.
19. Lee S, Bacha F, Gungor N, Arslanian SA: **Waist circumference is an independent predictor of insulin resistance in black and white youths.** *J Pediatr* 2006, **148**:188-194.
20. Xu L, Li M, Yin J, Cheng H, Yu M, Zhao X, Xiao X, Mi J: **Change of body composition and adipokines and their relationship with insulin resistance across pubertal development in obese and nonobese Chinese children: the BCAMS study.** *Int J Endocrinol* 2012, **2012**:389108.
21. Bush NC, Darnell BE, Oster RA, Goran MI, Gower BA: **Adiponectin is lower among African Americans and is independently related to insulin sensitivity in children and adolescents.** *Diabetes* 2005, **54**:2772-2778.
22. Lee S, Bacha F, Gungor N, Arslanian SA: **Racial differences in adiponectin in youth: relationship to visceral fat and insulin sensitivity.** *Diabetes Care* 2006, **29**:51-56.
23. Bacha F, Arslanian SA: **Ghrelin suppression in overweight children: a manifestation of insulin resistance?** *J Clin Endocrinol Metab* 2005, **90**:2725-2730.
24. Lambadiari V, Mitrou P, Maratou E, Raptis AE, Tountas N, Raptis SA, Dimitriadis G: **Thyroid hormones are positively associated with insulin resistance early in the development of type 2 diabetes.** *Endocrine* 2011, **39**:28-32.
25. Kobzova J, Vignerova J, Blaha P, Krejcovsky L, Riedlova J: **The 6th nationwide anthropological survey of children and adolescents in the Czech Republic in 2001.** *Cent Eur J Public Health* 2004, **12**:126-130.
26. Aldhoon-Hainerová I, Zamrazilová H, Atkinson RL, Dušátková L, Sedláčková B, Hlavaty P, Lee ZP, Kunešová M, Hainer V: **Clinical and laboratory characteristics of 1179 Czech adolescents evaluated for antibodies to human adenovirus 36.** *Int J Obes (Lond)* 2014, **38**:285-291.
27. Haffner SM, Kennedy E, Gonzalez C, Stern MP, Miettinen H: **A prospective analysis of the HOMA model. The Mexico City Diabetes Study.** *Diabetes Care* 1996, **19**:1138-1141.
28. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsén B, Lahti K, Nissén M, Taskinen MR, Group L: **Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome.** *Diabetes Care* 2001, **24**:683-689.
29. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J, IDF Epidemiology Task Force Consensus Group: **The metabolic syndrome—a new worldwide definition.** *Lancet* 2005, **366**:1059-1062.
30. Hill M, Parizek A, Kancheva R, Dusková M, Velíková M, Kríz L, Klímková M, Pasková A, Zizka Z, Matucha P, Meloun M, Stárka L: **Steroid metabolome in plasma from the umbilical artery, umbilical vein, maternal cubital vein and in amniotic fluid in normal and preterm labor.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010, **21**:594-610.
31. Brandou F, Brun JF, Mercier J: **Limited accuracy of surrogates of insulin resistance during puberty in obese and lean children at risk for altered glucoregulation.** *J Clin Endocrinol Metab* 2005, **90**:761-767.
32. Kuhl J, Hilding A, Ostenson CG, Grill V, Efendic S, Bavenholm P: **Characterisation of subjects with early abnormalities of glucose tolerance in the Stockholm Diabetes Prevention Programme: the impact of sex and type 2 diabetes heredity.** *Diabetologia* 2005, **48**:35-40.
33. DECODE Study Group: **Age- and sex-specific prevalences of diabetes and impaired glucose regulation in 13 European cohorts.** *Diabetes Care* 2003, **26**:61-69.
34. Brufani C, Tozzi A, Fintini D, Ciampalini P, Grossi A, Fiori R, Klepe D, Manco M, Schiaffini R, Porzio O, Cappa M, Barbetti F: **Sexual dimorphism of body composition and insulin sensitivity across pubertal development in obese Caucasian subjects.** *Eur J Endocrinol* 2009, **160**:769-775.
35. Yin J, Li M, Xu L, Wang Y, Cheng H, Zhao X, Mi J: **Insulin resistance determined by Homeostasis Model Assessment (HOMA) and associations with metabolic syndrome among Chinese children and teenagers.** *Diabetol Metab Syndr* 2013, **15**:71.

36. Bovy-Westphal A, Geisler C, Onur S, Korth O, Selberg O, Schrezenmeir J, Müller MJ: **Value of body fat mass vs anthropometric obesity indices in the assessment of metabolic risk factors.** *Int J Obes (Lond)* 2006, **30**:475–483.
37. Bao W, Srinivasan SR, Berenson G: **Persistent elevation of plasma insulin levels is associated with increased cardiovascular risk in children and young adults. The Bogalusa Heart Study.** *Circulation* 1996, **93**:54–59.
38. Kelishadi R, Cook SR, Amra B, Adibi A: **Factors associated with insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease among youths.** *Atherosclerosis* 2009, **204**:538–543.
39. Denzer C, Thiere D, Muche R, Koenig W, Mayer H, Kratzer W, Wabitsch M: **Gender-specific prevalences of fatty liver in obese children and adolescents: roles of body fat distribution, sex steroids, and insulin resistance.** *J Clin Endocrinol Metab* 2009, **94**:3872–3881.
40. Mason JE, Starke RD, Van Kirk JE: **Gamma-glutamyl transferase: a novel cardiovascular risk biomarker.** *Prev Cardiol* 2010, **13**:36–41.
41. Moriarty-Kelsey M, Harwood JE, Travers SH, Zeitler PS, Nadeau KJ: **Testosterone, obesity and insulin resistance in young males: evidence for an association between gonadal dysfunction and insulin resistance during puberty.** *J Pediatr Endocrinol Metab* 2010, **23**:1281–1287.
42. Silha JV, Krsek M, Skrha JV, Sucharda P, Nyomba BL, Murphy LJ: **Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlations with insulin resistance.** *Eur J Endocrinol* 2003, **149**:331–335.
43. Cnop M, Landchild MJ, Vidal J, Havel PJ, Knowles NG, Carr DR, Wang F, Hull RL, Boyko EJ, Retzlaff BM, Walden CE, Knopp RH, Kahn SE: **The concurrent accumulation of intra-abdominal and subcutaneous fat explains the association between insulin resistance and plasma leptin concentrations: distinct metabolic effects of two fat compartments.** *Diabetes* 2002, **51**:1005–1015.
44. Pannaciuoli N, De Mitrio V, Marino R, Giorgino R, De Pergola G: **Effect of glucose tolerance status on PAI-1 plasma levels in overweight and obese subjects.** *Obes Res* 2002, **10**:717–725.
45. Roef GL, Rietzschel ER, Van Daele CM, Taes YE, De Buyzere ML, Gillebert TC, Kaufman JM: **Triiodothyronine and free thyroxine levels are differentially associated with metabolic profile and adiposity-related cardiovascular risk markers in euthyroid middle-aged subjects.** *Thyroid* 2014, **24**:223–231.
46. Bouchalová M: *Development during childhood and its influences: Brno growth study.* Prague: Avicenum; 1987.

doi:10.1186/1758-5996-6-100

Cite this article as: Aldhoon-Hainerová et al.: Glucose homeostasis and insulin resistance: prevalence, gender differences and predictors in adolescents. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 2014 **6**:100.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



4.3 Běžná varianta genu *BDNF* je asociovaná s příjmem vápníku u adolescentů

Autoři: Dušátková L., Zamrazilová H., Aldhoon-Hainerová I., Sedláčková B., Včelák J., Hlavatý P., Bendlová B., Kunešová M., Hainer V.

Nutrition Research 2015, 35(9):766–773. IF = 2,472

Abstrakt: Vysoká exprese kandidátních genů pro obezitu v hypotalamu indikuje jejich roli v regulaci energetické rovnováhy. Cílem této studie bylo zhodnotit vztah 10 variant genů *TMEM18*, *SH2B1*, *KCTD15*, *PCSK1*, *BDNF*, *SEC16B*, *MC4R* a *FTO* u 1 035 neobézních a 918 obézních adolescentů k celkovému energetickému příjmu a příjmu tuků, proteinů, cukrů, vlákniny a vápníku. Rizikové alely rs7561317 *TMEM18*, rs10913469 *SEC16B* a rs9939609 *FTO* byly asociovány s vyšší tělesnou hmotností a BMI ($p < 0,005$). Varianta genu *FTO* rovněž ukázala pozitivní asociaci s obvodem pasu a tělesným tukem ($p < 0,001$). Obézní adolescenti měli nižší celkový energetický příjem a příjem vápníku ($p < 0,001$), naopak procentuální zastoupení tuků ($p = 0,009$) a proteinů bylo vyšší ($p < 0,001$) oproti neobézním jedincům. U 3 z 10 studovaných genových variant byly nalezeny asociace s jednotlivými nutričními komponentami. Rs17782313 genu *MC4R* byl negativně asociován s příjmem proteinů ($p = 0,012$) a pozitivně s vlákninou ($p = 0,032$). Nižší příjem vápníku byl zaznamenán u nosičů rizikových alel rs925946 *BDNF* ($p = 0,001$) a rs9939609 *FTO* ($p = 0,037$). Po Bonferroniho korekci významnost genů *FTO* a *MC4R* vymizela. Studie tedy poukázala na možné ovlivnění příjmu vápníku běžnou variantou genu *BDNF*, a to nezávisle na BMI.

U této práce jsem se podílela na sběru a analýze dat, vyhodnocování výsledků a sepsání manuskriptu.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.nrjournal.com

Original Research

A common variant near *BDNF* is associated with dietary calcium intake in adolescents



Lenka Dušátková^{a,b,*}, Hana Zamrazilová^a, Irena Aldhoon-Hainerová^{a,c},
Barbora Sedláčková^{a,b}, Josef Včelák^a, Petr Hlavatý^a, Běla Bendlová^a,
Marie Kunešová^a, Vojtěch Hainer^a

^a Institute of Endocrinology, Národní 8, CZ-116 94 Prague, Czech Republic

^b Faculty of Science, Charles University in Prague, Albertov 6, CZ-128 43 Prague, Czech Republic

^c Department of Pediatrics and Center for Research of Diabetes, Metabolism and Nutrition, Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Šrobárova 50, CZ-100 34 Prague, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 January 2015

Revised 30 May 2015

Accepted 8 June 2015

Keywords:

Adolescence

Obesity

Dietary intake

Single nucleotide polymorphism

FTO

BDNF

ABSTRACT

Specific targets for most obesity candidate genes discovered by genome-wide association studies remain unknown. Such genes are often highly expressed in the hypothalamus, indicating their role in energy homeostasis. We aimed to evaluate the associations of selected gene variants with adiposity and dietary traits. Anthropometric parameters, fat mass, dietary intake (total energy, fat, protein, carbohydrate, fiber, and calcium) and 10 gene variants (in/near *TMEM18*, *SH2B1*, *KCTD15*, *PCSK1*, *BDNF*, *SEC16B*, *MC4R* and *FTO*) were analyzed in 1953 Czech individuals aged 10.0 to 18.0 years (1035 nonoverweight and 918 overweight: body mass index [BMI] \geq 90th percentile). Obesity risk alleles of *TMEM18* rs7561317, *SEC16B* rs10913469, and *FTO* rs9939609 were related to increased body weight and BMI ($P < .005$). The *FTO* variant also showed a significant positive association with waist circumference and fat mass ($P < .001$). Overweight adolescents had a lower total energy intake ($P < .001$) but a higher percentage of fat ($P = .009$) and protein intake ($P < .001$) than the nonoverweight subjects. There was also a lower calcium intake in the overweight group ($P < .001$). An association with at least one component of dietary intake was found in 3 of 10 studied gene variants. The *MC4R* rs17782313 was associated negatively with protein ($P = .012$) and positively associated with fiber ($P = .032$) intakes. The obesity risk alleles of *BDNF* rs925946 and *FTO* rs9939609 were related to a lower calcium intake ($P = .001$ and $.037$). The effects of *FTO* and *MC4R* variants, however, disappeared after corrections for multiple testing. Our results suggest that the common *BDNF* variant may influence dietary calcium intake independent of BMI.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: BDNF, brain-derived neurotrophic factor; BMI, body mass index; FTO, fat mass and obesity associated; GWAS, genome-wide association study; KCTD15, potassium channel tetramerization domain containing 15; MC4R, melanocortin 4 receptor; PCSK1, proprotein convertase subtilisin/kexin type 1; SEC16B, SEC16 homolog B (*Saccharomyces cerevisiae*); SH2B1, SH2B adaptor protein 1; SNP, single nucleotide polymorphism; TMEM18, transmembrane protein 18.

* Corresponding author at: Obesity Management Center, Institute of Endocrinology, Národní 8, CZ-116 94 Prague, Czech Republic. Tel.: +420 723519898; fax: +420 224905325.

E-mail address: ldusatkova@gmail.com (L. Dušátková).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2015.06.004>

0271-5317/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The high worldwide prevalence of obesity in children and adolescents is most likely due to a combination of unhealthy lifestyles, characterized by an imbalance between energy intake and expenditure, and genetic predispositions. Family and twin studies have shown that not only body weight but also energy and nutrient intake are genetically determined. However, only a few susceptibility loci associated with dietary intake have so far been identified [1,2].

Genomewide association studies (GWASs) have proved to be a powerful tool in detecting gene variants associated with body mass index (BMI) and obesity. The latest and largest GWAS meta-analysis conducted in 2015 discovered 97 common gene variants related to BMI, of which 56 were novel [3]. Besides the first reported variants in the fat mass and obesity associated gene (*FTO*), additional susceptibility loci have been replicated in children and adolescents, for example, in/near the melanocortin 4 receptor gene (*MC4R*), transmembrane protein 18 gene (*TMEM18*), *SH2B* adaptor protein 1 gene (*SH2B1*), potassium channel tetramerization domain containing 15 gene (*KCTD15*), brain-derived neurotrophic factor gene (*BDNF*), *SEC16* homolog B (*Saccharomyces cerevisiae*) gene (*SEC16B*), and proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 gene (*PCSK1*) [4–6]. The mechanisms of how these genes regulate body weight remain to be elucidated in most cases. Nevertheless, the involvement of these genes in energy homeostasis and with possible impacts on dietary intake is suspected, as most of these genes are highly expressed in the central nervous system, especially in the hypothalamus [3].

In several studies, *FTO* variants have been associated with energy intake, in particular with dietary fat intake [7,8]. Moreover, it has been shown that a high-fat diet strengthens the association of *FTO* variants with obesity [9]. The most recent study of 16094 children and adolescents confirmed the association of an *FTO* variant with total energy intake but not with fat intake [10]. This study further showed that a lower protein intake attenuated the effect of *FTO* on BMI [10]. Another large-scale analysis (177330 adults) showed a positive association of *FTO* variant with dietary protein intake [11]. Common *MC4R* variants have mostly been related to eating behavior [12]. Only few studies have investigated the role of other obesity candidate genes in dietary intake. Rukh et al [13] showed an individual effect of *BDNF* rs4923461 and protein intake on BMI. There is also evidence of the potential roles of *SH2B1*, *KCTD15*, and *BDNF* variants in nutrient-specific food preferences [14,15]. Several studies have focused on the relationship between GWAS loci and dietary traits, but with inconsistent results.

We hypothesized that the mechanism of selected gene variants on BMI is mediated through the effect on dietary intake. Firstly, dietary intake was evaluated in nonoverweight and overweight Czech adolescents. Secondly, we examined the association of gene variants with adiposity and dietary traits and if dietary intake modifies the association of these gene variants with BMI.

2. Methods and materials

2.1. Study population

The present study included 1953 adolescents (877 boys and 1076 girls) aged 10.0 to 18.0 years who participated in the

Childhood Obesity Prevalence And Treatment project and for whom anthropometric characteristics, data on dietary intake, and genotypes were available (Figure). The cohort was classified as nonoverweight if BMI was less than the 90th percentile ($n = 1035$) and overweight/obese if BMI was at least the 90th percentile ($n = 918$; 76% obese: BMI ≥ 97 th percentile) according to the Czech BMI references specified for sex and age [16]. The design of the original Childhood Obesity Prevalence and Treatment project has already been described in detail [17]. All participants and their parent(s) provided written informed consent before the initiation of the study. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Institute of Endocrinology and was in accordance with the Helsinki Declaration II.

2.2. Adiposity characteristics

Body height, body weight, BMI, and waist circumference were assessed using standard protocols. The z-scores were calculated using an age- and sex-matched Czech reference population [16]. Reference data of a German adolescent population were used for the waist circumference [18]. Total body fat and trunk fat were measured by bioimpedance (Tanita BC-418 MA; Tanita Corporation, Tokyo, Japan). A detailed description of all procedures has previously been published [17].

2.3. Dietary characteristics

The average daily dietary intake was evaluated using a self-reported 3-day dietary record (2 weekdays and 1 weekend day) that was filled out by each participant with the assistance of a family member. Daily intakes of energy (kilojoules per day), macronutrients-carbohydrates, fat, and protein (grams per day and the percentage of total energy intake), fiber (grams per day), and calcium (milligrams per day) were calculated from the records using NutriMaster software (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA).

2.4. Genotyping

Ten single nucleotide polymorphisms (SNPs) were investigated: rs7561317 (*TMEM18*), rs7498665 (*SH2B1*), rs29941 (*KCTD15*), rs6232 and rs6235 (*PCSK1*), rs925946 and rs4923461 (*BDNF*), rs10913469 (*SEC16B*), rs17782313 (*MC4R*), and rs9939609 (*FTO*). According to our previous findings, SNPs in both the *PCSK1* (rs6232, rs6235) and the *BDNF* (rs925946, rs4923461) are incompletely linked; therefore, these were analyzed separately [19]. Genotyping was performed using the TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on a Biomark (Fluidigm, South San Francisco, CA, USA) and LightCycler 480 (Roche, Basel, Switzerland) as described by Dušátková et al [19].

2.5. Statistical analyses

Hardy-Weinberg equilibrium was verified using the χ^2 test, and risk allele frequency was determined for each SNP. Because of the non-Gaussian distribution, quantitative characteristics are described as medians with lower and upper quartiles.

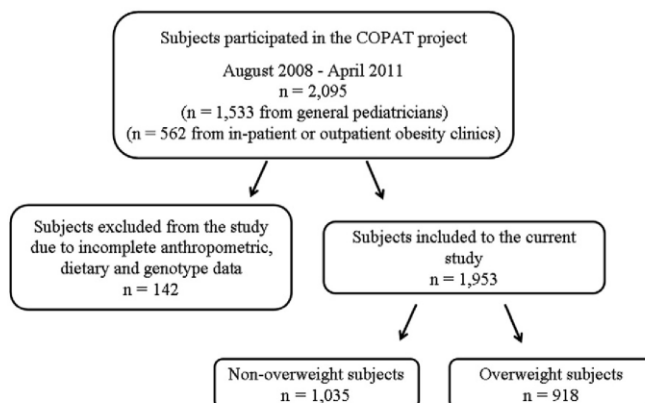


Figure – Subject flowchart.

To eliminate the skewed distribution and heteroscedasticity, original data were further normalized by a Box-Cox transformation. Differences of quantitative traits (adiposity and dietary characteristics) between nonoverweight and overweight cohorts and associations of genotype with these traits were analyzed using a general linear regression assuming additive model. When the minor allele frequency was less than 20%, minor homozygotes and heterozygotes for such a genotype were combined. Coefficient estimates (β) and standard errors (SEs) are reported using transformed data. All analyses were adjusted for sex and age. Significant associations with adiposity and dietary characteristics were additionally adjusted for BMI. The relationship between SNPs and BMI was also tested in 4 groups defined by quartiles of total energy and individual nutrient consumption to detect possible interactions between particular SNPs, dietary intake, and BMI. Statistical analyses were done in NCSS 2004 (NCSS, LLC, Kaysville, UT, USA) and Statgraphics Centurion, version XV (Statpoint Technologies, Inc, Warrenton, VA, USA). Results were considered statistically significant at P value $< .05$. An additional Bonferroni correction for multiple testing considered the results statistically significant at a significance level of $.05/10 = .005$ according to the 10 independent loci analyzed in our study.

3. Results

Adiposity and dietary characteristics of the studied adolescents are shown in Table 1. Despite being significantly younger, the overweight group had a higher z-height than the nonoverweight group (Table 1). The overweight individuals had a significantly lower intake of total energy and of carbohydrate, fat, and protein compared to the nonoverweight adolescents. However, the contributions of fat and protein to total energy intake were significantly higher and the percentage of energy from carbohydrates was lower in the overweight than in the nonoverweight group (Table 1). No differences in fiber intake were observed, but the daily intake of calcium was lower in the overweight group (Table 1).

All SNPs studied followed the Hardy-Weinberg equilibrium ($P > .05$). The risk allele frequencies and association analyses of SNPs with adiposity characteristics are presented in Table 2. Of the total studied variants, SNPs of 3 genes, *TMEM18*, *SEC16B*, and *FTO*, showed a relation to body adiposity traits (Table 2), with the strongest association for *FTO* rs9939609. The associations of these variants with body weight and BMI remained significant after correcting for multiple testing. In all 3 variants (*TMEM18*, *SEC16B*, and *FTO*), neither waist circumference nor the percentage of total and trunk fat remained statistically significant after additional adjustment for BMI; moreover, the associations of *SEC16B* did not survive Bonferroni correction (Table 2). The SNP *PCSK1* rs6235 had a borderline association with body height (Table 2).

Linear regression analyses of 10 SNPs with dietary intake are shown in Table 3. Three gene variants showed significant associations with individual nutrients. The obesity risk allele of *MC4R* rs17782313 was negatively associated with the percentage of daily intake of protein. The trend was not linear, however, as the greatest differences were found between heterozygous and risk homozygous carriers. A significant but nonlinear association was further observed for the intake of fiber. The carriers of the obesity risk allele of *MC4R* were found to have an increased intake of fiber (Table 3). Associations of the *MC4R* variant with both protein and fiber intakes remained statistically significant after additional adjustment for BMI ($P = .007$ and $P = .032$, respectively) but not after correcting for multiple testing. Obesity risk alleles of *BDNF* rs925946 and *FTO* rs9939609 were associated with a lower intake of calcium (Table 3). After the adjustment for BMI, the association disappeared for *FTO* ($P = .164$) but persisted for *BDNF* ($P = .002$) even after an additional Bonferroni correction. None of the studied SNPs was associated with macronutrient intake expressed in grams (data not shown). The effect sizes of SNPs on BMI were also tested in 4 categories according to quartiles of the total energy intake or of the intake of each nutrient, but no significant interactions were found (data not shown).

Table 1 – Adiposity and dietary characteristics of the study population according to the body weight

| Characteristics | Nonoverweight | Overweight | P |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| n | 1035 | 918 | |
| Boys/girls | 473/562 | 404/514 | |
| Age (y) | 16.1 (15.2; 17.0) | 15.2 (13.7; 16.7) | <.001 ^a |
| Body height (cm) | 170 (164; 177) | 168 (162; 175) | .791 |
| Body height z-score | -0.1 (-0.7; 0.6) | 0.2 (-0.5; 0.8) | .001 |
| Body weight (kg) | 58.6 (53.0; 65.0) | 80.4 (71.6; 92.8) | <.001 |
| Body weight z-score | -0.1 (-0.7; 0.4) | 2.6 (1.7; 3.7) | <.001 |
| BMI (kg/m ²) | 20.3 (19.1; 21.8) | 28.4 (26.0; 31.6) | <.001 |
| BMI z-score | -0.1 (-0.6; 0.4) | 3.0 (2.0; 4.1) | <.001 |
| Waist circumference (cm) | 69.5 (66.0; 73.0) | 87.5 (81.0; 95.0) | <.001 |
| Waist circumference z-score | -0.5 (-0.9; -0.1) | 1.7 (0.9; 2.6) | <.001 |
| Total fat (%) | 19.2 (14.9; 23.9) | 33.2 (28.3; 38.3) | <.001 |
| Trunk fat (%) | 14.4 (10.9; 18.9) | 28.5 (23.3; 33.6) | <.001 |
| Total energy intake (kJ/d) | 9356 (7765; 11587) | 8174 (6550; 10089) | <.001 |
| Carbohydrate intake (% E) | 53.0 (49.3; 56.7) | 51.6 (47.2; 55.7) | <.001 |
| Carbohydrate intake (g/d) | 297 (240; 369) | 248 (194; 316) | <.001 ^b |
| Fat intake (% E) | 32.9 (29.5; 36.3) | 33.6 (30.1; 37.6) | .009 |
| Fat intake (g/d) | 81.6 (65.1; 103.1) | 72.7 (57.0; 93.7) | .001 ^b |
| Protein intake (% E) | 13.7 (12.3; 15.3) | 14.5 (13.0; 16.2) | <.001 |
| Protein intake (g/d) | 77.0 (63.6; 93.3) | 72.4 (57.7; 91.9) | <.001 ^b |
| Fiber (g/d) | 11.0 (8.0; 14.0) | 11.0 (8.0; 14.0) | .267 |
| Calcium (mg/d) | 776 (596; 1014) | 712 (520; 937) | <.001 |

Quantitative data are described as medians (lower; upper quartiles). E, total energy intake. P values were derived from a general linear model adjusted for sex and age.

^a Adjusted for sex only.

^b Adjusted for sex, age, and total energy intake.

4. Discussion

Compared with nutrient recommendations [20], the daily amount of total energy and macronutrients in individuals of both weight categories in our studied cohort was lower except for the amount of fat intake, which was higher in nonoverweight subjects. As a percentage of the total energy intake, the amount of carbohydrates and protein was lower than recommended for both weight groups, whereas the percentage of fat was higher [20]. A comparison of dietary intake between overweight and nonoverweight groups showed a significantly lower intake of total energy, carbohydrate, fat, and protein in the overweight group than in the nonoverweight group. We are aware of the fact that the overweight group was significantly younger than the nonoverweight group. In our opinion, however, it is highly unlikely that this finding is due to the age difference (16.1 vs 15.2 years). This finding is in line with other published studies showing that overweight adolescents consume fewer calories than their nonoverweight counterparts [21–23]. Several other possible explanations are necessary to take into account. There may be differences in energy expenditure and therefore different energy intake requirements between these 2 weight categories. We did not assess the level of physical activity in our subjects. Underreporting of daily food intake, especially in obese individuals, may also be suspected [24]. The overweight group further derived a greater percentage of their energy from fat and less from carbohydrate than their normal-weight peers, which corresponds to previous reports [22,23].

The beneficial role of a higher intake of fiber on body weight has been documented [25]. We found no differences

between overweight and nonoverweight groups, although both of them consumed less fiber than recommended (11 g/d vs the recommended 22–30 g/d) [20]. This is very similar to the data from the National Health and Nutrition Examination Survey (2009–2010) in which children and adolescents consumed less than 14 g/d of fiber [26]. A low level of dietary calcium intake increases the risk of obesity in adults and adolescents [27–29]. In our cohort, overweight subjects demonstrated a significantly lower intake of calcium than their nonoverweight counterparts. Moreover, the intake of calcium was much lower than the recommended amounts in both groups (712 and 776 mg/d in overweight and nonoverweight, respectively, vs the recommended 1100–1200 mg/d) [20], which is in line with a study of Slovenian adolescents [30].

We confirmed the association of SNPs in *TMEM18*, *SEC16B*, and *FTO* with BMI. The study of den Hoed et al [6] found an even a stronger association of the *TMEM18* and *SEC16B* variants with BMI in children and adolescents than in adults. In our results, the *FTO* variant also demonstrated an influence on body fat content after Bonferroni correction. However, after adjustment for BMI, the associations with waist circumference and total fat mass disappeared. Our results thus support the hypothesis that common gene variants determine obesity in general but not body fat distribution [31]. The observed association of *PCSK1* rs6235 with body height has not yet been described elsewhere. On the contrary, a study of Li et al [32] found a relationship between *MC4R* rs17782313 and body height that we failed to confirm.

In our study, we found significant associations for the *BDNF*, *FTO*, and *MC4R* variants tested with at least one component of dietary intake. Both *BDNF* rs925946 and *FTO*

Table 2 – Association of 10 SNPs with adiposity characteristics

| SNP | Risk allele (%) | Body height (cm) | | | Body weight (kg) | | | BMI (kg/m ²) | | | Waist circumference (cm) | | | Total fat (%) | | | Trunk fat (%) | | |
|----------------------------------|-----------------|------------------|-------|------|------------------|-------|--------------------|--------------------------|-------|--------------------|--------------------------|-------|-------------------|---------------|-------|--------------------|---------------|-------|--------------------|
| | | β | SE | P | β | SE | P | β | SE | P | β | SE | P | β | SE | P | β | SE | P |
| rs7561317 (TMEM18) ^a | G (85.2) | 0.002 | 0.001 | .229 | 0.013 | 0.004 | .001 ^c | 0.013 | 0.004 | .002 ^c | 0.030 | 0.009 | .001 ^c | 0.003 | 0.001 | .078 | 0.007 | 0.004 | .066 |
| rs7498665 (SH2B1) | G (42.3) | 0.000 | 0.002 | .468 | –0.001 | 0.006 | .957 | –0.001 | 0.005 | .761 | –0.003 | 0.013 | .563 | 0.001 | 0.002 | .697 | 0.003 | 0.005 | .519 |
| rs29941 (KCTD15) | G (69.7) | –0.003 | 0.002 | .311 | –0.002 | 0.007 | .947 | 0.002 | 0.007 | .948 | 0.007 | 0.015 | .881 | 0.001 | 0.002 | .532 | 0.005 | 0.006 | .333 |
| rs6232 (PCSK1) ^a | C (5.1) | 0.000 | 0.002 | .914 | 0.006 | 0.006 | .306 | 0.007 | 0.006 | .248 | 0.013 | 0.014 | .364 | 0.001 | 0.002 | .521 | 0.004 | 0.006 | .437 |
| rs6235 (PCSK1) | G (26.0) | 0.003 | 0.002 | .042 | 0.014 | 0.008 | .225 | 0.010 | 0.008 | .316 | 0.025 | 0.018 | .384 | 0.003 | 0.003 | .455 | 0.008 | 0.007 | .450 |
| rs25946 (BDNF) | T (27.5) | –0.004 | 0.002 | .278 | –0.003 | 0.007 | .461 | 0.001 | 0.007 | .404 | –0.002 | 0.016 | .458 | 0.000 | 0.003 | .862 | –0.001 | 0.006 | .795 |
| rs4923461 (BDNF) | A (78.6) | –0.001 | 0.003 | .969 | 0.009 | 0.009 | .573 | 0.011 | 0.009 | .444 | 0.023 | 0.020 | .514 | 0.007 | 0.003 | .081 | 0.015 | 0.008 | .157 |
| rs10913469 (SEC16B) ^a | C (17.3) | 0.000 | 0.001 | .955 | 0.012 | 0.004 | .004 ^c | 0.012 | 0.004 | .002 ^c | 0.022 | 0.009 | .014 | 0.004 | 0.001 | .010 | 0.008 | 0.004 | .033 |
| rs17782313 (MC4R) | C (27.7) | –0.002 | 0.002 | .475 | 0.009 | 0.007 | .183 | 0.012 | 0.007 | .088 | 0.028 | 0.016 | .150 | 0.005 | 0.003 | .081 | 0.009 | 0.006 | .225 |
| rs9939609 (FTO) | A (47.7) | –0.001 | 0.002 | .662 | 0.024 | 0.005 | <.001 ^c | 0.027 | 0.005 | <.001 ^c | 0.058 | 0.012 | .836 ^b | 0.009 | 0.002 | <.001 ^c | 0.021 | 0.005 | <.001 ^c |

^a Minor homozygotes and heterozygotes were combined for analyses. Coefficient estimates and SEs were reported for additive model using transformed data. P values were derived from a linear regression adjusted for sex and age.

^b Adjusted for sex, age, and BMI.

^c P values of statistical significance after Bonferroni correction for multiple testing.

Table 3 – Association of 10 SNPs with self-reported dietary intake

| SNP | Total energy (kJ/d) | | | Carbohydrate (%) | | | Fat (%) | | | Protein (%) | | | Fiber (g/d) | | | Calcium (mg/d) | | |
|----------------------------------|---------------------|-------|------|------------------|-------|------|---------|-------|------|-------------|-------|------|-------------|-------|------|----------------|-------|-------------------|
| | β | SE | P | β | SE | P | β | SE | P | β | SE | P | β | SE | P | β | SE | P |
| rs7561317 (TMEM18) ^a | 0.000 | 0.001 | .760 | 0.002 | 0.004 | .614 | -0.002 | 0.003 | .537 | 0.000 | 0.004 | .972 | 0.002 | 0.002 | .418 | 0.005 | 0.005 | .338 |
| rs7498665 (SH2B1) | 0.000 | 0.002 | .995 | 0.004 | 0.005 | .600 | -0.001 | 0.004 | .652 | -0.009 | 0.005 | .220 | -0.003 | 0.003 | .588 | -0.003 | 0.007 | .751 |
| rs29941 (KCTD15) | -0.004 | 0.002 | .093 | 0.006 | 0.006 | .313 | -0.005 | 0.005 | .236 | -0.001 | 0.006 | .968 | 0.000 | 0.004 | .644 | -0.009 | 0.008 | .448 |
| rs6232 (PCSK1) ^a | 0.001 | 0.002 | .719 | 0.003 | 0.006 | .568 | -0.003 | 0.004 | .446 | 0.002 | 0.006 | .695 | 0.004 | 0.004 | .296 | 0.006 | 0.007 | .435 |
| rs6235 (PCSK1) | -0.002 | 0.002 | .176 | 0.000 | 0.007 | .963 | -0.001 | 0.005 | .871 | 0.003 | 0.007 | .891 | 0.001 | 0.005 | .979 | -0.001 | 0.010 | .051 |
| rs925946 (BDNF) | -0.003 | 0.002 | .293 | 0.004 | 0.007 | .537 | -0.001 | 0.005 | .636 | -0.007 | 0.007 | .560 | -0.003 | 0.004 | .544 | -0.030 | 0.009 | .001 ^b |
| rs4923461 (BDNF) | -0.001 | 0.002 | .831 | -0.010 | 0.008 | .475 | 0.007 | 0.006 | .389 | 0.004 | 0.008 | .523 | -0.001 | 0.005 | .962 | 0.007 | 0.010 | .650 |
| rs10913469 (SEC16B) ^a | -0.001 | 0.001 | .335 | -0.001 | 0.004 | .850 | 0.001 | 0.003 | .834 | 0.000 | 0.004 | .924 | -0.001 | 0.002 | .678 | -0.001 | 0.005 | .852 |
| rs17782313 (MC4R) | -0.001 | 0.002 | .897 | 0.002 | 0.006 | .610 | 0.002 | 0.005 | .092 | -0.012 | 0.006 | .012 | 0.002 | 0.004 | .032 | 0.000 | 0.008 | .597 |
| rs9939609 (FTO) | -0.002 | 0.001 | .274 | 0.001 | 0.005 | .752 | 0.001 | 0.004 | .472 | -0.004 | 0.005 | .556 | -0.002 | 0.003 | .289 | -0.016 | 0.006 | .037 |

^a Minor homozygotes and heterozygotes were combined for analyses. Coefficient estimates and SEs were reported for additive model using transformed data. P values were derived from a linear regression adjusted for sex and age.

^b P values of statistical significance after Bonferroni correction for multiple testing.

rs9939609 were associated with a lower intake of calcium. However, only the BDNF variant still showed a significant relation to the intake of calcium after both Bonferroni correction for multiple testing and adjustment for BMI, whereas the association of the FTO variant disappeared after each of these corrections. We assume that this association is mainly driven by the effect of FTO variant on BMI. BDNF is a member of the nerve growth factor family and has been shown to be a downstream effector of MC4R anorexigenic actions [33]. Mutations in BDNF have been reported in rare cases of severe early-onset obesity manifested with hyperphagia and cognitive impairment [34]. The possible effect of dietary calcium on body weight is mediated by increasing postprandial fat oxidation, fecal fat excretion, and a modulation of lipolysis and lipogenesis [35]. An association between calcium intake and adiposity has been shown by several studies in both adults and children [27–29]. However, a link between dietary calcium and the regulation of energy homeostasis, particularly through melanocortin signaling, is still lacking. A recently published study found no association between genetic risk score comprising BMI-related SNPs and calcium intake [36]. Interestingly, the authors of that study observed an interaction of waist circumference-related SNPs and calcium intake on waist circumference reduction [36]. More studies focused on calcium intake in relation to obesity gene variants are needed.

We also found associations of MC4R rs17782313 with the percentage of energy derived from protein and with fiber intake, which remained significant after adjustment for BMI but not after correcting for multiple testing. Only one study has shown a relationship of this gene variant to a higher intake of protein in women [37]. Fiber intake has rarely been studied in relation to MC4R variants, although one study found an association of genetic risk score including this MC4R variant with higher fiber intake [13]. Hasselbalch et al [38] found a positive association of MC4R variants with the intake

of energy from whole grains; but after controlling for multiple testing, the significance disappeared, similarly as in our study. There is clear evidence that protein and fiber induce satiety [39,40]. We may speculate about the possible link between MC4R and energy balance via the intake of protein and fiber by promoting satiety.

None of the studied SNPs was associated with the total energy intake, percentage of energy intake from carbohydrate and fat, or macronutrient intake expressed in grams. A population-based study of 12462 adults also did not find any associations of these SNPs with lifestyle factors including frequency of consuming fat or carbohydrate [41]. Bauer et al [14] described an association of SH2B1 with increased fat intake and KCTD15 with carbohydrate intake. According to our analysis, the associations between SNPs of TMEM18, SEC16B, and FTO and higher BMI were independent of dietary intakes, which correspond to observations of other studies [13,41].

The strength of our study is the homogenous population-based cohort of adolescents including both overweight and nonoverweight subjects and detailed data on dietary intake. To minimize bias, the 3-day dietary records of 1953 individuals were evaluated by only 2 nutritionists. However, our study has some limitations that need to be addressed. As mentioned above, dietary intake based on self-reported records and the lack of data on physical activity may impact the actual energy balance. Despite the fact that underreporting is common, especially in children and overweight subjects [24,42], the study of Börnhorst et al [43] achieved relative success in validating dietary recalls in young children. Another limitation is the size of our cohort, which may not be sufficient to detect possible weak effects of gene variants and their interactions with environmental factors. Such interactions might be even smaller than the marginal effects of SNPs on BMI or diet alone [44,45]. Discrepancies between studies investigating the interaction of dietary patterns with genetic variation may frequently be caused by limitations mentioned above. Nevertheless, the

fact that genetic predisposition defined by common gene variants influences and is modulated by lifestyle factors seems to be undoubted.

In conclusion, our results were not able to confirm the hypothesis that common obesity risk variants (in/near *TMEM18*, *SH2B1*, *KCTD15*, *PCSK1*, *BDNF*, *SEC16B*, *MC4R*, and *FTO*) contribute to adiposity through effects on dietary intake. However, the obesity risk allele of *BDNF* rs925946 was associated with a lower calcium intake independent of BMI even after correction for multiple testing.

Acknowledgment

This study was supported by grants NT/13792-4 and NT/12342-5 from the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic and CZ0123 from Norway through the Norwegian Financial Mechanisms. The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Faith MS, Rha SS, Neale MC, Allison DB. Evidence for genetic influences on human energy intake: results from a twin study using measured observations. *Behav Genet* 1999;29:145–54.
- Garver WS, Newman SB, Gonzales-Pacheco DM, Castillo JJ, Jelinek D, Heidenreich RA, et al. The genetics of childhood obesity and interaction with dietary macronutrients. *Genes Nutr* 2013;8:271–87. <http://dx.doi.org/10.1007/s12263-013-0339-5>.
- Locke AE, Kahali B, Berndt SI, Justice AE, Pers TH, Day FR, et al. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature* 2015;518:197–206. <http://dx.doi.org/10.1038/nature14177>.
- Nead KT, Li A, Wehner MR, Neupane B, Gustafsson S, Butterworth A, et al. Contribution of common non-synonymous variants in *PCSK1* to body mass index variation and risk of obesity: a systematic review and meta-analysis with evidence from up to 331 175 individuals. *Hum Mol Genet* 2015. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddv097>.
- Zhao J, Bradfield JP, Li M, Wang K, Zhang H, Kim CE, et al. The role of obesity-associated loci identified in genome-wide association studies in the determination of pediatric BMI. *Obesity (Silver Spring)* 2009;17:2254–7. <http://dx.doi.org/10.1038/oby.2009.159>.
- Den Hoed M, Ekelund U, Brage S, Grontved A, Zhao JH, Sharp SJ, et al. Genetic susceptibility to obesity and related traits in childhood and adolescence: influence of loci identified by genome-wide association studies. *Diabetes* 2010;59:2980–8. <http://dx.doi.org/10.2337/db10-0370>.
- Cecil JE, Tavendale R, Watt P, Hetherington MM, Palmer CNA. An obesity-associated *FTO* gene variant and increased energy intake in children. *N Engl J Med* 2008;359:2558–66. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0803839>.
- Timpson NJ, Emmett PM, Frayling TM, Rogers I, Hattersley AT, McCarthy MI, et al. The fat mass- and obesity-associated locus and dietary intake in children. *Am J Clin Nutr* 2008;88:971–8.
- Sonestedt E, Roos C, Gullberg B, Ericson U, Wirfält E, Orho-Melander M. Fat and carbohydrate intake modify the association between genetic variation in the *FTO* genotype and obesity. *Am J Clin Nutr* 2009;90:1418–25. <http://dx.doi.org/10.3945/ajcn.2009.27958>.
- Qi Q, Downer MK, Kilpeläinen TO, Taal HR, Barton SJ, Ntalla I, et al. Dietary intake, *FTO* genetic variants and adiposity: a combined analysis of over 16,000 children and adolescents. *Diabetes* 2015. <http://dx.doi.org/10.2337/db14-1629>.
- Qi Q, Kilpeläinen TO, Downer MK, Tanaka T, Smith CE, Sluijs I, et al. *FTO* genetic variants, dietary intake and body mass index: insights from 177,330 individuals. *Hum Mol Genet* 2014;23:6961–72. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddu411>.
- Stutzmann F, Cauchi S, Durand E, Calvacanti-Preonça C, Pigeyre M, Hartikainen A-L, et al. Common genetic variation near *MC4R* is associated with eating behaviour patterns in European populations. *Int J Obes (Lond)* 2009;33:373–8. <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2008.279>.
- Rukh G, Sonestedt E, Melander O, Hedblad B, Wirfält E, Ericson U, et al. Genetic susceptibility to obesity and diet intakes: association and interaction analyses in the Malmö Diet and Cancer Study. *Genes Nutr* 2013;8:535–47. <http://dx.doi.org/10.1007/s12263-013-0352-8>.
- Bauer F, Elbers CC, Adan RA, Loos RJ, Onland-Moret NC, Grobbee DE, et al. Obesity genes identified in genome-wide association studies are associated with adiposity measures and potentially with nutrient-specific food preference. *Am J Clin Nutr* 2009;90:951–9. <http://dx.doi.org/10.3945/ajcn.2009.27781>.
- McCaffery JM, Papandonatos GD, Peter I, Huggins GS, Raynor HA, Delahanty LM, et al. Obesity susceptibility loci and dietary intake in the Look AHEAD Trial. *Am J Clin Nutr* 2012;95:1477–86. <http://dx.doi.org/10.3945/ajcn.111.026955>.
- Kobzová J, Vignerová J, Bláha P, Krejčovský L, Riedlová J. The 6th nationwide anthropological survey of children and adolescents in the Czech Republic in 2001. *Cent Eur J Public Health* 2004;12:126–30.
- Aldhoon-Hainerová I, Zamrazilová H, Atkinson RL, Dušátková L, Sedláčková B, Hlavatý P, et al. Clinical and laboratory characteristics of 1179 Czech adolescents evaluated for antibodies to human adenovirus 36. *Int J Obes (Lond)* 2014;38:285–91. <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2013.72>.
- Haas G-M, Liepold E, Schwandt P. Percentile curves for fat patterning in German adolescents. *World J Pediatr* 2011;7:16–23. <http://dx.doi.org/10.1007/s12519-011-0241-4>.
- Dušátková L, Zamrazilová H, Sedláčková B, Včelák J, Hlavatý P, Aldhoon Hainerová I, et al. Association of obesity susceptibility gene variants with metabolic syndrome and related traits in 1,443 Czech adolescents. *Folia Biol (Praha)* 2013;59:123–33.
- Schnur E. Umsetzung der D-A-CH-Referenzwerte in die Gemeinschaftsverpflegung. Erläuterungen und Tabellen. Bonn: Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V; 2013.[Internet], [cited 2014 Dec 6]. German. Available from <http://www.dge.de/fileadmin/public/doc/gv/GV-Umsetzung-Referenzwerte-QST-2013.pdf>.
- Skinner AC, Steiner MJ, Perrin EM. Self-reported energy intake by age in overweight and healthy-weight children in NHANES, 2001–2008. *Pediatrics* 2012;130:e936–42. <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2012-0605>.
- Hassapidou M, Fotiadou E, Maglara E, Papadopoulou SK. Energy intake, diet composition, energy expenditure, and body fatness of adolescents in northern Greece. *Obesity (Silver Spring)* 2006;14:855–62. <http://dx.doi.org/10.1038/oby.2006.99>.
- Garulet M, Martínez A, Victoria F, Pérez-Llamas F, Ortega RM, Zamora S. Difference in dietary intake and activity level between normal-weight and overweight or obese adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30:253–8.
- Johansson L, Solvöll K, Bjørneboe GE, Drevon CA. Under- and overreporting of energy intake related to weight status and lifestyle in a nationwide sample. *Am J Clin Nutr* 1998;68:266–74.
- Brauchla M, Juan W, Story J, Kranz S. Sources of dietary fiber and the association of fiber intake with childhood obesity

- risk (in 2-18 year olds) and diabetes risk of adolescents 12-18 year olds: NHANES 2003-2006. *J Nutr Metab* 2012;2012:736258. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/736258>.
- [26] Storey M, Anderson P. Income and race/ethnicity influence dietary fiber intake and vegetable consumption. *Nutr Res* 2014;34:844–50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2014.08.016>.
- [27] Chaput J-P, Sjödén AM, Astrup A, Després J-P, Bouchard C, Tremblay A. Risk factors for adult overweight and obesity: the importance of looking beyond the “big two”. *Obes Facts* 2010;3:320–7. <http://dx.doi.org/10.1159/000321398>.
- [28] Goldberg TBL, da Silva CC, Peres LNL, Berbel MN, Heigasi MB, Ribeiro JMC, et al. Calcium intake and its relationship with risk of overweight and obesity in adolescents. *Arch Latinoam Nutr* 2009;59:14–21.
- [29] Tidwell DK, Valliant MW. Higher amounts of body fat are associated with inadequate intakes of calcium and vitamin D in African American women. *Nutr Res* 2011;31:527–36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2011.06.005>.
- [30] Fidler Mis N, Kobe H, Stimec M. Dietary intake of macro- and micronutrients in Slovenian adolescents: comparison with reference values. *Ann Nutr Metab* 2012;61:305–13. <http://dx.doi.org/10.1159/000342469>.
- [31] Haupt A, Thamer C, Heni M, Machicao F, Machann J, Schick F, et al. Novel obesity risk loci do not determine distribution of body fat depots: a whole-body MRI/MRS study. *Obesity (Silver Spring)* 2010;18:1212–7. <http://dx.doi.org/10.1038/oby.2009.413>.
- [32] Li S, Zhao JH, Luan J, Luben RN, Rodwell SA, Khaw K-T, et al. Cumulative effects and predictive value of common obesity-susceptibility variants identified by genome-wide association studies. *Am J Clin Nutr* 2010;91:184–90. <http://dx.doi.org/10.3945/ajcn.2009.28403>.
- [33] Nicholson JR, Peter J-C, Lecourt A-C, Barde Y-A, Hofbauer KG. Melanocortin-4 receptor activation stimulates hypothalamic brain-derived neurotrophic factor release to regulate food intake, body temperature and cardiovascular function. *J Neuroendocrinol* 2007;19:974–82. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2826.2007.01610.x>.
- [34] Gray J, Yeo GSH, Cox JJ, Morton J, Adlam A-LR, Keogh JM, et al. Hyperphagia, severe obesity, impaired cognitive function, and hyperactivity associated with functional loss of one copy of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene. *Diabetes* 2006;55:3366–71. <http://dx.doi.org/10.2337/db06-0550>.
- [35] Soares MJ, She-Ping-Delfos WLC. Postprandial energy metabolism in the regulation of body weight: is there a mechanistic role for dietary calcium? *Nutrients* 2010;2:586–98. <http://dx.doi.org/10.3390/nu2060586>.
- [36] Larsen SC, Ångquist L, Ahluwalia TS, Skaaby T, Roswall N, Tjønneland A, et al. Interaction between genetic predisposition to obesity and dietary calcium in relation to subsequent change in body weight and waist circumference. *Am J Clin Nutr* 2014;99:957–65. <http://dx.doi.org/10.3945/ajcn.113.076596>.
- [37] Qi L, Kraft P, Hunter DJ, Hu FB. The common obesity variant near MC4R gene is associated with higher intakes of total energy and dietary fat, weight change and diabetes risk in women. *Hum Mol Genet* 2008;17:3502–8. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddn242>.
- [38] Hasselbalch AL, Ångquist L, Christiansen L, Heitmann BL, Kyvik KO, Sørensen TIA. A variant in the fat mass and obesity-associated gene (FTO) and variants near the melanocortin-4 receptor gene (MC4R) do not influence dietary intake. *J Nutr* 2010;140:831–4. <http://dx.doi.org/10.3945/jn.109.114439>.
- [39] Lyon MR, Kaciniuk V. Is there a place for dietary fiber supplements in weight management? *Curr Obes Rep* 2012;1:59–67. <http://dx.doi.org/10.1007/s13679-012-0016-9>.
- [40] Paddon-Jones D, Westman E, Mattes RD, Wolfe RR, Astrup A, Westerterp-Plantenga M. Protein, weight management, and satiety. *Am J Clin Nutr* 2008;87:1558S–61S.
- [41] Holzapfel C, Grallert H, Huth C, Wahl S, Fischer B, Döring A, et al. Genes and lifestyle factors in obesity: results from 12,462 subjects from MONICA/KORA. *Int J Obes (Lond)* 2010;34:1538–45. <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2010.79>.
- [42] Burrows TL, Martin RJ, Collins CE. A systematic review of the validity of dietary assessment methods in children when compared with the method of doubly labeled water. *J Am Diet Assoc* 2010;110:1501–10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jada.2010.07.008>.
- [43] Börnhorst C, Bel-Serrat S, Pigeot I, Huybrechts I, Ottavaere C, Sioen I, et al. Validity of 24-h recalls in (pre-)school aged children: comparison of proxy-reported energy intakes with measured energy expenditure. *Clin Nutr* 2014;33:79–84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2013.03.018>.
- [44] Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, Monda KL, Thorleifsson G, Jackson AU, et al. Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat Genet* 2010;42:937–48. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.686>.
- [45] Dempfle A, Scherag A, Hein R, Beckmann L, Chang-Claude J, Schäfer H. Gene-environment interactions for complex traits: definitions, methodological requirements and challenges. *Eur J Hum Genet* 2008;16:1164–72. <http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2008.106>.

4.4 Klinické a laboratorní charakteristiky 1 179 českých adolescentů s ohledem na přítomnost protilátek proti adenoviru 36

Autoři: Aldhoon-Hainerová I., Zamrazilová H., Atkinson R.L., Dušátková L., Sedláčková B., Hlavatý P., Lee Z.P., Kunešová M., Hainer V.

International Journal of Obesity (Lond) 2013; 38(2):285–291. IF = 5,004

Abstrakt: Publikované studie asociací Adv36 s obezitou a metabolickými ukazateli u dětí byly doposud poměrně malé a nepřinesly jednoznačné závěry. Práce zkoumala vztah adenovirové infekce k tělesné hmotnosti a antropometrickým a kardiometabolickým parametrům u souboru 1 179 českých adolescentů. Celkem 26,5 % adolescentů bylo pozitivních na protilátku proti Adv36 (z nich 22,3 % mělo podváhu, 21,5 % normální hmotnost, 40 % nadváhu a 28 % obezitu). Míra rizika pro nadváhu, resp. obezitu při pozitivním titru protilátek proti Adv36 byla 2,61 (95% CI 1,77–3,86; $p < 0,001$), resp. 1,46 (95% CI 1,07–1,99; $p = 0,016$). Významně vyšší záchyt pozitivního titru protilátek proti Adv36 byl pozorován u dívek (32,5 %) oproti chlapcům (19,7 %; $p < 0,001$). Adv36 pozitivita byla asociována s tělesnou hmotností ($p = 0,042$), BMI ($p = 0,015$), obvodem boků ($p = 0,004$), z-skórem tělesné výšky ($p = 0,029$) a celkovým a trunkálním tělesným tukem ($p < 0,001$), u dívek navíc s tělesnou výškou a obvodem pasu ($p = 0,01$). Adolescenti s pozitivním titrem protilátek proti Adv36 dále vykazovali významně vyšší hladiny celkového cholesterolu, lipoproteinu o nízké denzitě (LDL) a nižší hladiny glykémie. Studie tedy prokázala souvislost infekce Adv36 s obezitou, zejména s nadváhou. Pozitivita byla dále asociována s tělesným složením a metabolismem tuků a glukózy.

U této práce jsem se podílela na sběru a analýze dat a revizi manuskriptu.

ORIGINAL ARTICLE

Clinical and laboratory characteristics of 1179 Czech adolescents evaluated for antibodies to human adenovirus 36

I Aldhoon-Hainerová^{1,2,5}, H Zamrazilová^{1,5}, RL Atkinson³, L Dušátková^{1,4}, B Sedláčková^{1,4}, P Hlavatý¹, ZP Lee³, M Kunešová¹ and V Hainer¹

BACKGROUND: Human adenovirus 36 (Adv36) is associated with obesity in children. Most prior studies have been small and the association of Adv36 status with markers of metabolic risks has been inconsistent.
OBJECTIVES: To determine the prevalence of Adv36 antibodies in different weight categories of adolescents and to evaluate the association of Adv36 infection with anthropometric parameters and cardiometabolic health risks.
SUBJECTS AND METHODS: In 1179 Czech adolescents (85 underweight, 506 normal weight, 160 overweight and 428 obese), the following variables were evaluated: anthropometric (body weight, height, body mass index, circumferences, fat mass), blood pressure, biochemical and hormonal (lipid profile, glucose, insulin, liver enzymes, adiponectin) and Adv36 antibodies (enzyme-linked immunosorbent assay).
RESULTS: Of the total cohort, 26.5% were positive for Adv36 antibodies (underweight: 22.3%; normal weight: 21.5%; overweight: 40.0% and obese: 28.0%). The odds ratio for Adv36 antibody positivity evaluated vs normal weight was 2.61 for overweight (95% confidence interval (CI): 1.77–3.86, $P < 0.001$) and 1.46 for obesity (95% CI: 1.07–1.99, $P = 0.016$). A significantly higher prevalence of Adv36 infection was observed in female subjects (32.5%) in comparison to male subjects (19.7%; $P < 0.001$). Adv36 positivity of the whole cohort was significantly related to body weight ($P = 0.042$), body mass index ($P = 0.015$), hip circumference ($P = 0.004$), body height z-score ($P = 0.029$), and total body fat ($P = 0.000$) and trunk fat ($P = 0.000$). Adv36 antibody-positive girls demonstrated significantly higher body height (167.8 vs 165.0 cm, $P = 0.01$) and waist circumference (77.0 vs 72.0 cm, $P = 0.01$). Infected adolescents exhibited significantly higher levels of total cholesterol (TC) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), but lower levels of blood glucose. Liver enzymes were significantly increased only in Adv36-positive boys.
CONCLUSION: These results demonstrated an association of Adv36 antibodies with obesity and an even greater association with overweight. Adv36 positivity was related to increased fat mass, levels of TC and LDL-C, but to decreased level of blood glucose. No relation to adiponectin levels was revealed.

International Journal of Obesity advance online publication, 4 June 2013; doi:10.1038/ijo.2013.72

Keywords: childhood obesity; adenovirus infection; Adv36; lipid profile; adiponectin; ELISA

INTRODUCTION

The prevalence of obesity has been increasing worldwide not only in adults but also in children and adolescents.¹ According to the criteria of the International Obesity Task Force, 17% of Czech girls and 25% of Czech boys are either overweight or obese.¹ Recent findings suggested that neither changes in food intake and physical activity nor changes in genetic background can be entirely responsible for the current obesity epidemic.² Other causal factors leading to body weight gain have been proposed.² Among these, infectious agents have been suggested to have a role in the pathogenesis of obesity.³ An inoculation of human adenovirus 36 (Adv36) into experimental animals, including chickens, mice and non-human primates, induced obesity through increasing the differentiation and proliferation of preadipocytes to adipocytes.⁴ In contrast to Adv36, Atkinson *et al.*⁵ failed to demonstrate any association of Adv2, Adv31 or Adv37 antibodies with body mass index (BMI) or serum lipids.⁵

During the past decade, several studies in humans have been investigating an association of antibodies to Adv36 with obesity

and obesity-related variables.⁶ The link between obesity rise and infection of Adv36 may be demonstrated by results of Almgren *et al.*⁷ These authors showed a rise of the Adv36 seropositivity in lean subjects from 7% in the 1990s of the past century to 20% in years 2002–2006, which is in line with the increase of obesity prevalence in Sweden. The prevalence of Adv36 antibodies in human serum ranges considerably (<5–>40%) and is dependent on factors as region, race, gender, age, body weight and perhaps detection method.⁸ In adults, the results of association of Adv36 with obesity have been somewhat conflicting. A significantly higher prevalence of Adv36 antibodies in obese subjects than in non-obese was confirmed in adults in the United States,⁵ in Italy,^{9,10} in severely obese Swedish female subjects⁷ and overweight but not obese Korean adults.¹¹ The prevalence of Adv36 seropositivity in obese adults in these studies ranged from 30 to 65%. A lack of association of Adv36 with obesity was found in Dutch and Belgian persons¹² and US military personnel.¹³ Goossens¹² *et al.* found an Adv36 prevalence of <6% in adults.

¹Obesity Management Center, Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic; ²Department of Pediatrics and Center for Research of Diabetes, Metabolism and Nutrition, Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic; ³Obetech Obesity Research Center, Richmond, VA, USA and ⁴Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic. Correspondence: Dr I Aldhoon-Hainerová, Obesity Management Center, Institute of Endocrinology, Národní 8, 116 94 Prague 1, Czech Republic. E-mail: ihainer@hotmail.com

⁵These authors contributed equally to this work.
Received 16 January 2013; revised 13 March 2013; accepted 25 April 2013; accepted article preview online 14 May 2013

Studies in children are more consistent. The first study on children¹⁴ showed that 30% of Korean obese subjects tested Adv36 positive and these had significantly higher BMI z-scores and waist circumference in comparison to uninfected subjects. Another study on Korean schoolchildren showed that more obese than non-obese subjects had Adv36 antibodies (28.6% vs 13.6%).¹⁵ This finding was also confirmed in 124 children in the United States (22% vs 7%).¹⁶ Infection with Adv36 has also been found more common in obese (28.8%) than in lean (20.1%) Swedish children.⁷ The prior studies were relatively small, with all fewer than 500 subjects.

Animal models proved that the infected animals, in spite of their increased adiposity, exhibited low serum levels of total cholesterol (TC) and triglycerides (TG).¹⁷ Studies of an association of the presence of Adv36 antibodies with serum lipids in humans led to inconsistent results.^{8,11} In agreement with animal models, Adv36-positive adults exhibited significantly lower serum TC and TG than Adv36-negative subjects.^{5,7} This was not confirmed by other adult studies.¹¹ A relationship of Adv36 status to lipid disorder was also found in Korean children, but in the opposite direction with obese Adv36-positive subjects presenting higher levels of TG and TC than Adv36-negative ones.¹⁵

In infected animals, Adv36 enhanced insulin sensitivity and improved hepatic steatosis.^{18,19} No association of Adv36 with insulin resistance was reported in Italian adult subjects.^{9,10} However, Adv36 seropositivity was found to be related to a lower occurrence of non-alcoholic fatty liver disease.¹⁰ A recently published meta-analysis of 10 observational studies concluded that Adv36 had not been associated with abnormal metabolic parameters.⁶

The primary aim of our study was to investigate the prevalence of Adv36 antibodies in underweight, normal weight, overweight and obese Czech adolescents and its relation to body weight status. Further, we investigated whether Adv36 seropositivity is associated with serum lipids, glucose homeostasis, insulin resistance, liver enzymes and adiponectin.

SUBJECTS AND METHODS

Study population

A total of 1179 Czech adolescents aged 13.0–17.9 years were included in this study. This cohort was randomly selected among weight categories from the Childhood Obesity Prevalence and Treatment (COPAT) project. This project was conducted between August 2008 and April 2011 and recruited adolescents across the whole country either from general pediatricians ($n = 1533$) or from in-patient or outpatient clinics ($n = 562$) specialized in childhood obesity. Blood samples were obtained from 85 underweight adolescents (BMI \leq 10th percentile; 48 girls, 37 boys), 506 normal weight adolescents (BMI = 25.0–74.9th percentile; 264 girls, 242 boys), 160 overweight adolescents (BMI = 90.0–96.9th percentile; 80 girls, 80 boys) and 428 obese adolescents (BMI \geq 97.0th percentile; 230 girls, 198 boys). To evaluate the weight status, the Czech references for BMI specified for sex and age were applied.²⁰ All participants and their parent(s) signed an informed consent before the initiation of study procedures. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Institute of Endocrinology in Prague and was in accordance with the Declaration of Helsinki II.

Anthropometry, body composition and clinical examination

Height was measured to the nearest 0.5 cm at the examination. Body weight (in underwear and without shoes) was measured using a BIA Tanita BC-418 MA scale (Tanita Corporation, Tokyo, Japan) to the nearest 100 g. Waist and hip circumferences were measured by standard procedures.²¹ BMI was calculated as body weight in kilograms divided by the square of the height in meters. Waist-to-height ratio was calculated as waist circumference (cm) divided by height (cm). Waist-to-hip ratio was calculated as waist circumference (cm) divided by hip circumference (cm). The body adiposity index was calculated using the equation: body adiposity index = ((hip circumference)/(height)1.5) – 18.²²

The z-score represents the number of standard deviations an individual subject deviates from the mean BMI of the age- and sex-matched general population. Z-scores of BMI, height, weight and hip circumference were calculated with data obtained from the Czech population as a reference.²⁰ Reference percentiles of the German adolescent population were used for the waist circumference.²³ The total amount of fat and trunk fat were assessed by electrical bioimpedance by BIA Tanita BC-418 MA (Tanita Corporation). In our previous pilot study in adolescents, we demonstrated that the trunk fat evaluated by bioimpedance significantly correlated with that measured by both magnetic resonance imaging and dual X-ray densitometry.²⁴

The average of two blood pressure measurements by Omron i-C10 (Omron Healthcare Co., Ltd, Kyoto, Japan) was used in the evaluation of possible hypertension according to the current recommendations.²⁵

Laboratory investigations

All samples were collected after an overnight fast. Biochemical parameters TC, high-density lipoprotein cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), TG, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and γ -glutamyltransferase were determined spectrophotometrically using a Cobas 6000 c501 analyzer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Serum insulin was assessed by immuno-electrochemiluminescence (Cobas 6000 e601 analyzer; Roche Diagnostic GmbH). Plasma adiponectin level was analyzed by Human Bio-Plex Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Homeostasis model assessment index of insulin resistance was calculated as fasting insulin \times fasting blood glucose/22.5.

Detection of Adv36 antibody in the serum

Adv36 antibodies were assayed using the competitive enzyme-linked immunosorbent assay method developed in the laboratory of the Obetech Obesity Research Center (Richmond, VA, USA).⁷ All samples were sent with only an identification number, and Obetech laboratory personnel were blind to group or individual information. Results of the assays were sent to the principal investigator for combination with clinical data and statistical analysis.

Statistical analyses

Owing to the non-Gaussian data distribution, data were expressed as medians with lower and upper quartiles. The data were analyzed using non-parametric Mann-Whitney test (for differences between two independent groups), Kruskal-Wallis one-way analysis of variance by rank test (for differences among three or more independent groups) and χ^2 test. Odds ratios and 95% confidence intervals (CI) were calculated by logistic regression analysis to determine associations between Adv36 and body weight (underweight, overweight and obese). Comparisons were made between underweight or overweight or obese vs normal weight individuals as controls. The statistical software NCS5 2004 (Kaysville, UT, USA) and Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) were used. *P*-values (two-tailed) < 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

The Adv36 frequencies in the whole cohort and according to the weight status

The baseline characteristics of the Czech adolescent cohort divided according to the weight status (underweight, normal weight, overweight and obese) are shown in Table 1. Of the total 1179 adolescents, 26.5% ($n = 312$) were positive for Adv36 antibodies. The frequency of Adv36-positive antibodies in the underweight group was 22.3%, in the normal weight group 21.5%, in the overweight group 40.0% and in the obese group 28.0% (Table 2). In the whole cohort, a significantly higher prevalence of Adv36 infection was observed in female subjects (32.5%) in comparison to male subjects (19.7%; $P < 0.001$) (Table 2). This significant gender difference was found in all weight groups except for the underweight group. Interestingly, 55.0% of overweight female subjects exhibited positivity for Adv36. There was no difference in Adv36 prevalence in relation to age, except for the overweight infected boys who were significantly older (16.5 vs 15.1 years, $P = 0.02$). The odds ratios for Adv36 antibody positivity are presented in Table 3.

Table 1. Characteristics of study population

| Parameter | UW, median (lower; upper quartiles) | NW, median (lower; upper quartiles) | OW, median (lower; upper quartiles) | OB, median (lower; upper quartiles) | P-value* |
|-----------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------|
| Age (years) | 16.16 (15.22; 17.12) | 15.98 (15.07; 16.92) | 15.53 (14.02; 16.94) | 15.17 (14.06; 16.43) | C, E |
| BMI (kg m ⁻²) | 17.16 (16.45; 17.57) | 20.51 (19.80; 21.26) | 24.67 (23.92; 25.59) | 31.33 (29.15; 34.25) | A-F |
| BMI z-score | -1.37 (-1.55; -1.22) | -0.07 (-0.30; 0.17) | 1.53 (1.28; 1.77) | 3.98 (3.14; 4.96) | A-F |
| Body weight (kg) | 48.10 (44.60; 51.80) | 59.60 (54.98; 64.60) | 71.75 (66.73; 78.30) | 94.05 (83.95; 103.68) | A-F |
| Body weight z-score | -1.40 (-1.62; -1.05) | -0.06 (-0.43; 0.32) | 1.34 (1.03; 1.83) | 3.86 (2.91; 4.80) | A-F |
| Body height (cm) | 168.0 (163.40; 173.50) | 170.0 (164.75; 177.23) | 169.10 (164.08; 176.0) | 169.40 (163.50; 175.50) | NS |
| Body height z-score | -0.38 (-0.83; 0.25) | -0.03 (-0.63; 0.64) | 0.16 (-0.55; 0.71) | 0.17 (-0.56; 0.79) | B, C |
| Waist circumference (cm) | 63.0 (61.0; 66.50) | 70.0 (67.0; 73.0) | 79.0 (76.0; 83.50) | 95.0 (90.0; 101.30) | A-F |
| Waist circumference z-score | -1.25 (-1.48; -0.98) | -0.48 (-0.77; -0.18) | 0.61 (0.38; 1.11) | 2.61 (2.01; 3.26) | A-F |
| Hip circumference (cm) | 85.80 (82.25; 88.75) | 93.0 (89.0; 96.0) | 100.70 (97.0; 103.50) | 113.50 (108.50; 119.0) | A-F |
| Hip circumference z-score | -1.19 (-1.48; -0.82) | -0.04 (-0.48; 0.31) | 1.29 (0.88; 1.66) | 3.10 (2.48; 3.89) | A-F |
| WHR | 0.75 (0.72; 0.79) | 0.76 (0.73; 0.79) | 0.79 (0.76; 0.83) | 0.85 (0.77; 0.89) | B-F |
| WHtR | 0.38 (0.36; 0.39) | 0.41 (0.40; 0.42) | 0.47 (0.45; 0.49) | 0.56 (0.53; 0.60) | A-F |
| BAI | 20.95 (19.26; 23.06) | 23.52 (21.16; 25.86) | 27.52 (25.02; 29.85) | 33.66 (30.44; 36.23) | A-F |
| BPS (mm Hg) | 114.0 (104.50; 123.0) | 120.0 (111.0; 128.0) | 121.0 (113.8; 130.0) | 122.0 (113.0; 131.0) | A-C, E |
| BPD (mm Hg) | 76.0 (69.0; 82.0) | 77.0 (71.25; 83.0) | 77.0 (72.0; 83.0) | 79.0 (74.0; 85.0) | C, E |
| Total fat (%) | 14.70 (11.90; 18.38) | 19.40 (14.95; 23.90) | 26.90 (21.0; 31.43) | 37.40 (32.15; 41.55) | A-F |
| Trunk fat (%) | 10.30 (7.70; 12.60) | 14.50 (11.30; 18.90) | 21.60 (16.75; 26.15) | 32.10 (27.60; 37.70) | A-F |
| FG (mmol l ⁻¹) | 4.96 (4.64; 5.30) | 4.90 (4.65; 5.17) | 4.97 (4.69; 5.28) | 4.98 (4.62; 5.27) | NS |
| Insulin (mIU l ⁻¹) | 9.17 (6.33; 12.38) | 9.08 (7.04; 11.91) | 11.75 (8.80; 15.66) | 16.49 (11.89; 24.69) | B-F |
| HOMA-IR | 1.92 (1.40; 2.77) | 2.0 (1.48; 2.70) | 2.63 (1.89; 3.54) | 3.63 (2.54; 5.81) | B-F |
| TC (mmol l ⁻¹) | 4.03 (3.64; 4.47) | 4.03 (3.54; 4.57) | 4.22 (3.74; 4.67) | 4.29 (3.68; 4.80) | E |
| HDL-C (mmol l ⁻¹) | 1.49 (1.31; 1.72) | 1.43 (1.23; 1.65) | 1.32 (1.14; 1.54) | 1.17 (1.02; 1.36) | B-F |
| TG (mmol l ⁻¹) | 0.74 (0.61; 1.02) | 0.79 (0.63; 1.04) | 0.94 (0.67; 1.23) | 1.05 (0.83; 1.61) | B-F |
| LDL-C (mmol l ⁻¹) | 2.06 (1.74; 2.53) | 2.14 (1.77; 2.6) | 2.43 (2.12; 2.86) | 2.54 (2.06; 3.03) | B-E |
| ALT (μkat l ⁻¹) | 0.26 (0.21; 0.31) | 0.26 (0.22; 0.32) | 0.32 (0.24; 0.45) | 0.38 (0.30; 0.59) | B-F |
| AST (μkat l ⁻¹) | 0.40 (0.35; 0.45) | 0.40 (0.35; 0.47) | 0.43 (0.35; 0.50) | 0.42 (0.36; 0.58) | E |
| GMT (μkat l ⁻¹) | 0.22 (0.18; 0.27) | 0.22 (0.18; 0.27) | 0.26 (0.20; 0.36) | 0.31 (0.23; 0.42) | B-F |
| Adiponectin (mg l ⁻¹) | 7.31 (4.99; 10.11) | 7.11 (4.74; 9.68) | 5.84 (4.54; 8.35) | 4.85 (3.51; 6.44) | C, E, F |

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BAI, body adiposity index; BMI, body mass index; BPD, diastolic blood pressure; BPS, systolic blood pressure; FG, fasting glucose; GMT, γ-glutamyltransferase; HDL-C, high-density lipoprotein-cholesterol; HOMA-IR, HOMA-IR, homeostasis model assessment index of insulin resistance; LDL-C, low-density lipoprotein-cholesterol; NW, normal weight group; OB, obese group; OW, overweight group; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; UW, underweight group; WHtR, waist-to-height ratio; WHR, waist-to-hip ratio. *P = Kruskal-Wallis multiple-comparison Z-value test. P-values <0.05 were considered statistically significant: A = UW vs NW, B = UW vs OW, C = UW vs OB, D = NW vs OW, E = NW vs OB, F = OW vs OB.

Table 2. Prevalence of antibody status (Adv36+ and Adv36-) in the study population according to weight categories and gender

| | | Adv36+ | Adv36- | n (%) | |
|----------------------------------|-------|------------|------------|--------------|---------------------------------|
| UW | | | | | |
| Girls | n (%) | 13 (27.1) | 35 (72.9) | 48 (100.0) | χ^2 test: 1.42; P = 0.233 |
| Boys | n (%) | 6 (16.2) | 31 (83.8) | 37 (100.0) | |
| Total | n (%) | 19 (22.3) | 66 (77.7) | 85 (100.0) | |
| NW | | | | | |
| Girls | n (%) | 66 (25.0) | 198 (75.0) | 264 (100.0) | χ^2 test: 3.91; P = 0.048 |
| Boys | n (%) | 43 (17.8) | 199 (82.2) | 242 (100.0) | |
| Total | n (%) | 109 (21.5) | 397 (78.5) | 506 (100.0) | |
| OW | | | | | |
| Girls | n (%) | 44 (55.0) | 36 (45.0) | 80 (100.0) | χ^2 test: 15.0; P < 0.001 |
| Boys | n (%) | 20 (25.0) | 60 (75.0) | 80 (100.0) | |
| Total | n (%) | 64 (40.0) | 96 (60.0) | 160 (100.0) | |
| OB | | | | | |
| Girls | n (%) | 79 (34.3) | 151 (65.7) | 230 (100.0) | χ^2 test: 9.81; P < 0.002 |
| Boys | n (%) | 41 (20.7) | 157 (79.3) | 198 (100.0) | |
| Total | n (%) | 120 (28.0) | 308 (72.0) | 428 (100.0) | |
| Total (UW + NW + OW + OB) | | | | | |
| Girls | n (%) | 202 (32.5) | 420 (67.5) | 622 (100.0) | χ^2 test: 24.46; P < 0.001 |
| Boys | n (%) | 110 (19.7) | 447 (80.3) | 557 (100.0) | |
| Total | n (%) | 312 (26.5) | 867 (73.5) | 1179 (100.0) | |

Abbreviations: Adv36, adenovirus 36; Adv36+, adenovirus 36 antibody positive; Adv36-, adenovirus 36 antibody negative; n, number; NW, normal weight group; OB, obese group; OW, overweight group; UW, underweight group.

The Adv36 status and studied parameters Table 4 represents the relationship of Adv36 antibody status to different studied variables of the whole cohort and also when

stratified by gender. Several anthropometric parameters (BMI, body weight, body height, hip circumference and fat amount) were found to be significantly increased in Adv36-positive

Table 3. Odds ratios for underweight, overweight and obesity according to the presence of Adv36 antibody

| | OR (95% CI)—unadjusted | P-value | OR (95% CI)—adjusted for sex and age | P-value |
|---------|------------------------|---------|--------------------------------------|---------|
| NW | Reference | | Reference | |
| UW | 1.05 (0.60–1.82) | 0.979 | 1.03 (0.59–1.79) | 0.930 |
| OW | 2.43 (1.66–3.55) | <0.001 | 2.61 (1.77–3.86) | <0.001 |
| OB | 1.42 (1.05–1.91) | 0.026 | 1.46 (1.07–1.99) | 0.016 |
| OW + OB | 1.66 (1.26–2.18) | <0.001 | 1.76 (1.33–2.34) | <0.001 |

Abbreviations: Adv36, adenovirus 36; CI, confidence interval; NW, normal weight group; OB, obese group; OR, odds ratio; OW, overweight group; UW, underweight group.

subjects independently of gender. However, gender analyses revealed that these effects were mainly expressed in female subjects (Table 4). Further, infected subjects of the whole cohort exhibited significantly higher levels of TC and LDL-C, but lower levels of blood glucose. Liver enzyme activities were significantly increased in Adv36-positive boys (Table 4).

Analyses taking into account both the weight category and the Adv36 status had also been undertaken (data not shown). Underweight Adv36-positive subjects had a greater hip circumference z-score than the uninfected subjects (-0.92 vs -1.2 , $P=0.02$). Normal weight individuals with Adv36-positive antibodies demonstrated higher level of LDL-C than those with Adv36-negative antibodies (2.25 vs 2.09 mmol l⁻¹, $P=0.03$). Overweight Adv36-positive subjects exhibited a greater amount of total and trunk fat than those uninfected (29.3% vs 24.7% , $P=0.005$; 24.7% vs 20.6% , $P=0.004$, respectively). However, these differences disappeared in the obese (data not shown). The level of blood glucose tended to be lower in Adv36-positive than in Adv36-negative cases, regardless of weight status, but reached a statistical significance only in the case of obese subjects (4.86 vs 5.03 mmol l⁻¹, $P=0.01$).

DISCUSSION

Our study of 1179 Czech adolescents is the largest study of Adv36 status in children to date. We found an overall Adv36 prevalence of 26.5%. Our results proved an association of Adv36 positivity with obesity and even a stronger relation to overweight. Interestingly, a higher prevalence of infected subjects among overweight has recently been published by Na *et al.*¹¹ In this study on Korean adults, 40% of overweight adults were infected in comparison to 32.8% normal weight and 30.0% obese adults. Reports performed in adults from the United States, Italy and Sweden found an association of Adv36 positivity mainly with obesity.^{5,7,9} Studies carried out in children from the United States,¹⁶ Sweden⁷ and Korea^{14,15} also showed this positive association. However, the study of Na *et al.*¹⁵ carried out in Korean children pointed out that the relationship of Adv36 positivity to obesity became nonsignificant when age, sex and lipid variables had been included in the analysis.¹⁵

The finding of a higher prevalence of Adv36 positivity in overweight than obese subjects may lead to several hypotheses. An existence of human genetic susceptibility to infectious disease has been well documented.²⁶ We assume that among individuals, there exists a genetic variability also in response to the Adv36 infection. In addition, infected overweight subjects may try harder to control their body weight. As we found that 55.0% of overweight girls were Adv36 antibody positive, the above hypothesis may especially be true for these girls. In this society,

girls tend to be under enormous pressure to be slim, and thus, try to keep their body weight down. We further postulate that some of the overweight subjects might have had a very mild exposure or had been recently infected. This may also be true for non-obese Adv36 antibody-positive subjects. On the other hand, we may speculate that some obese individuals were infected long ago and antibody titers had dropped so low that they could not be determined by our assay. We are aware of the lack of longitudinal assessment of these children. It would be highly interesting to see whether over time the infected children would gain more weight than their uninfected controls.

In the group of normal weight Czech children, 21.5% tested positive for Adv36 antibodies, which corresponds to the finding in lean Swedish children (20.1%).⁷ The prevalence of Adv36 infection in 59 non-obese Korean children (BMI <85 percentile) was 13.56%¹⁵ and in non-obese children in the United States, the prevalence was 7%.¹⁶ In Korean normal weight adults, the prevalence of Adv36 positivity was 32.8%.¹¹

In the study of Korean and US children, the prevalence of Adv36 infection was similar in girls and in boys.^{15,16} A significantly higher overall Adv36 seroprevalence was found in Italian adult men than in women (56.2% vs 36.1%, $P=0.006$).⁹ Our data also show a gender difference related to Adv36 infection. The prevalence of Adv36-positive boys gradually increased from underweight (16.2%) to overweight (25.0%), but then dropped with obesity (20.7%). In general, a higher percentage of girls had Adv36 antibodies than did boys (32.5% vs 19.7%, χ^2 : 24.46, $P<0.001$). The study of US military personnel also demonstrated a significant association between Adv36 positivity and female gender ($P=0.036$).¹³ We postulate that estrogens might have a role in the susceptibility to infection with Adv36. James *et al.*²⁷ showed that the presence of estrogen in tissue culture was associated with increased adenovirus replication. Recently published results also found that estradiol treatment of estrogen receptor-positive breast cancer cells increases coxsackie and adenovirus receptor levels and thus enhances adenoviral transduction.²⁸ Additional studies are necessary to determine if there is a role of estrogen in the susceptibility to Adv36 infection in children and/or adults.

Measures of body fat and correlation with Adv36 status are of particular interest. Most studies used waist circumference as a measure of body fat distribution and serum neutralization as the method to assess Adv36 status. Atkinson *et al.*¹⁴ and Gabbert *et al.*¹⁶ found a significantly greater waist circumference in Adv36-positive obese children, but Na *et al.*¹⁵ did not. All three of these studies used serum neutralization assay. Our study and that of Almgren *et al.*⁷ used an enzyme-linked immunosorbent assay for Adv36 status, which has been shown to be more sensitive than is serum neutralization.⁷ Almgren *et al.*⁷ did not measure waist circumference and obesity status was assessed by BMI alone. Na *et al.*¹⁵ was the first Adv36 study to use electrical bioimpedance to assess body fat in children. They did not find a correlation of body fat with Adv36 status, but they used serum neutralization to assess Adv36 status. Ours is the first study combining the assessment of Adv36 by enzyme-linked immunosorbent assay and measurement of body adiposity by both waist circumference and electrical bioimpedance. We found no correlation of waist circumference with Adv36 status in the whole population, but Adv36-positive girls had a significantly larger waist. There was a strong correlation of total body fat and trunk fat with Adv36 status in our total population and in girls, but boys analyzed separately did not show a correlation.

We report an association of Adv36 antibody status to greater body height. Na *et al.*¹⁵ found that both overweight and obese Adv36-positive subjects were shorter than their antibody-negative counterparts. In the study of Gabbert *et al.*¹⁶ Adv36-positive children were taller ($P=0.03$).¹⁶ However, the infected children in that study were also significantly older than the Adv36-negative

Table 4. Characteristics of study population according to the presence of the Adv36 antibody in the whole cohort, in girls and in boys

| Parameter | ALL, median (lower quartile; upper quartile) | | | Girls, median (lower quartile; upper quartile) | | | Boys, median (lower quartile; upper quartile) | | |
|-----------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------|---------|------------------------------------------------|-------------------------|---------|-----------------------------------------------|----------------------|---------|
| | Adv36+ (n = 312) | Adv36- (n = 867) | P-value | Adv36+ (n = 202) | Adv36- (n = 420) | P-value | Adv36+ (n = 110) | Adv36- (n = 447) | P-value |
| Age (years) | 15.75 (14.63; 16.94) | 15.57 (14.41; 16.77) | 0.141 | 15.72 (14.49; 16.98) | 15.68 (14.58; 17.53) | 0.952 | 15.85 (15.02; 17.63) | 15.45 (14.33; 16.67) | 0.072 |
| BMI (kg m ⁻²) | 24.61 (20.66; 30.16) | 21.96 (20.13; 29.55) | 0.015 | 24.84 (20.66; 30.42) | 21.7 (20.14; 30.11) | 0.035 | 24.49 (20.60; 29.92) | 22.34 (20.12; 28.98) | 0.256 |
| BMI z-score | 1.48 (-0.01; 3.60) | 0.37 (-0.16; 3.35) | 0.020 | 1.62 (0.04; 3.84) | 0.37 (-0.16; 3.66) | 0.040 | 1.23 (-0.08; 3.21) | 0.36 (-0.17; 3.05) | 0.426 |
| Body weight (kg) | 71.50 (58.53; 90.33) | 67.10 (57.70; 86.30) | 0.042 | 69.85 (57.28; 87.40) | 62.0 (54.83; 82.78) | 0.007 | 76.6 (63.98; 96.90) | 70.80 (62.30; 92.0) | 0.100 |
| Body weight z-score | 1.42 (0.04; 3.53) | 0.64 (-0.27; 3.04) | 0.002 | 1.58 (0.08; 3.87) | 0.58 (-0.26; 3.29) | 0.005 | 1.06 (-0.12; 2.91) | 0.69 (-0.28; 2.88) | 0.341 |
| Body height (cm) | 169.0 (164.5; 175.0) | 170.0 (164.0; 176.50) | 0.613 | 167.0 (162.70; 170.10) | 165.50 (161.50; 169.20) | 0.008 | 177.20 (170.20; 182.60) | 175.0 (170.0; 180.5) | 0.073 |
| Body height z-score | 0.18 (-0.53; 0.69) | -0.03 (-0.66; 0.66) | 0.029 | 0.17 (-0.45; 0.65) | -0.10 (-0.71; 0.60) | 0.006 | 0.24 (-0.64; 0.84) | 0.10 (-0.60; 0.75) | 0.644 |
| Waist circumference (cm) | 78.50 (69.3; 92.0) | 75.0 (68.50; 91.50) | 0.130 | 77.0 (68.0; 90.0) | 72.0 (66.50; 89.0) | 0.014 | 80.75 (72.60; 95.25) | 77.50 (71.50; 95.0) | 0.280 |
| Waist circumference z-score | 0.54 (-0.44; 2.19) | 0.19 (-0.61; 2.21) | 0.080 | 0.54 (-0.56; 1.99) | -0.20 (-0.77; 1.85) | 0.013 | 0.55 (-0.20; 2.47) | 0.44 (-0.42; 2.61) | 0.349 |
| Hip circumference (cm) | 100.50 (93.50; 111.0) | 97.0 (91.0; 110.0) | 0.004 | 100.50 (94.0; 112.0) | 98.10 (91.75; 110.0) | 0.025 | 100.25 (92.0; 108.85) | 96.90 (90.0; 109.0) | 0.203 |
| Hip circumference z-score | 1.15 (-0.01; 2.72) | 0.71 (-0.28; 2.60) | 0.013 | 1.29 (0.07; 2.89) | 0.70 (-0.24; 2.69) | 0.014 | 0.85 (-0.14; 2.47) | 0.71 (-0.30; 2.57) | 0.505 |
| WHR | 0.79 (0.74; 0.83) | 0.79 (0.75; 0.84) | 0.388 | 0.76 (0.73; 0.81) | 0.75 (0.72; 0.79) | 0.090 | 0.82 (0.79; 0.87) | 0.82 (0.78; 0.87) | 0.482 |
| BAI | 0.46 (0.41; 0.54) | 0.44 (0.40; 0.54) | 0.082 | 0.47 (0.41; 0.54) | 0.43 (0.40; 0.54) | 0.058 | 0.46 (0.41; 0.54) | 0.44 (0.41; 0.55) | 0.443 |
| BPS (mmHg) | 27.80 (23.67; 32.10) | 26.28 (22.64; 31.45) | 0.006 | 29.37 (25.55; 33.96) | 27.65 (25.06; 34.22) | 0.189 | 24.01 (21.06; 28.28) | 23.81 (20.79; 29.26) | 0.855 |
| BPD (mmHg) | 119.0 (111.0; 127.0) | 121.0 (111.25; 129.0) | 0.126 | 116.0 (107.0; 123.0) | 116.0 (108.0; 124.0) | 0.600 | 125.0 (117.50; 139.50) | 125.0 (116.0; 134.0) | 0.168 |
| Total fat (%) | 78.0 (72.0; 84.0) | 78.0 (72.0; 84.0) | 0.789 | 77.0 (71.0; 82.0) | 77.0 (72.0; 83.0) | 0.704 | 78.0 (73.50; 85.0) | 78.0 (72.0; 84.50) | 0.208 |
| Trunk fat (%) | 27.40 (20.43; 35.35) | 24.10 (16.50; 32.90) | 0.000 | 30.70 (24.20; 38.0) | 26.75 (22.40; 37.95) | 0.011 | 19.30 (15.20; 26.20) | 17.80 (14.40; 25.65) | 0.067 |
| FG (mmol l ⁻¹) | 22.65 (15.53; 30.38) | 19.25 (12.50; 28.90) | 0.000 | 25.95 (19.28; 33.30) | 22.40 (16.85; 32.15) | 0.007 | 16.25 (11.18; 24.90) | 14.30 (10.80; 25.85) | 0.701 |
| Insulin (mIU l ⁻¹) | 4.87 (4.62; 5.14) | 4.97 (4.69; 5.25) | 0.007 | 4.78 (4.78; 5.07) | 4.82 (4.54; 5.13) | 0.403 | 5.06 (4.74; 5.31) | 5.08 (4.84; 5.32) | 0.457 |
| HOMA-IR | 11.90 (8.31; 16.72) | 11.08 (7.97; 16.17) | 0.466 | 12.24 (8.60; 16.14) | 11.29 (8.47; 15.87) | 0.632 | 10.71 (7.22; 20.31) | 10.74 (7.60; 16.47) | 0.752 |
| TC (mmol l ⁻¹) | 2.59 (1.76; 3.66) | 2.40 (1.72; 3.63) | 0.633 | 2.62 (1.78; 3.45) | 2.40 (1.75; 3.60) | 0.677 | 2.43 (1.60; 4.34) | 2.39 (1.70; 3.72) | 0.771 |
| HDL-C (mmol l ⁻¹) | 4.24 (3.69; 4.77) | 4.10 (3.61; 4.62) | 0.032 | 4.38 (3.74; 4.96) | 4.24 (3.83; 4.86) | 0.540 | 4.03 (3.58; 4.54) | 3.90 (3.44; 4.48) | 0.213 |
| TG (mmol l ⁻¹) | 1.33 (1.13; 1.56) | 1.34 (1.13; 1.55) | 0.794 | 1.36 (1.17; 1.63) | 1.44 (1.19; 1.66) | 0.199 | 1.26 (1.02; 1.42) | 1.26 (1.08; 1.46) | 0.453 |
| LDL-C (mmol l ⁻¹) | 0.93 (0.70; 1.28) | 0.88 (0.66; 1.26) | 0.193 | 0.95 (0.70; 1.29) | 0.92 (0.70; 1.3) | 0.846 | 0.90 (0.69; 1.26) | 0.85 (0.64; 1.21) | 0.202 |
| ALT (µkat l ⁻¹) | 2.39 (1.98; 2.85) | 2.26 (2.26; 2.74) | 0.007 | 2.47 (2.05; 2.91) | 2.36 (1.95; 2.87) | 0.101 | 2.27 (1.93; 2.65) | 2.17 (1.76; 2.69) | 0.179 |
| AST (µkat l ⁻¹) | 0.29 (0.23; 0.42) | 0.30 (0.24; 0.40) | 0.814 | 0.27 (0.21; 0.35) | 0.27 (0.22; 0.36) | 0.554 | 0.33 (0.29; 0.46) | 0.33 (0.26; 0.46) | 0.007 |
| AST (µkat l ⁻¹) | 0.41 (0.35; 0.48) | 0.41 (0.35; 0.48) | 0.806 | 0.38 (0.33; 0.43) | 0.37 (0.32; 0.42) | 0.108 | 0.46 (0.41; 0.54) | 0.45 (0.39; 0.54) | 0.069 |
| GMT (µkat l ⁻¹) | 0.25 (0.19; 0.36) | 0.26 (0.20; 0.34) | 0.223 | 0.22 (0.18; 0.29) | 0.23 (0.18; 0.30) | 0.244 | 0.32 (0.25; 0.46) | 0.28 (0.23; 0.38) | 0.024 |
| Adiponectin (mg l ⁻¹) | 5.91 (4.13; 8.61) | 5.82 (4.09; 8.36) | 0.624 | 6.38 (4.45; 9.13) | 6.61 (4.48; 9.60) | 0.639 | 5.47 (3.83; 7.48) | 5.39 (3.86; 7.61) | 0.790 |

Abbreviations: Adv36, adenovirus 36; Adv36+, adenovirus 36 antibody positive; Adv36-, adenovirus 36 antibody negative; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; BMI, body adiposity index; BMI, body mass index; BPD, diastolic blood pressure; BPS, systolic blood pressure; FG, fasting glucose; GMT, γ-glutamyltransferase; HDL-C, high-density lipoprotein-cholesterol; HOMA-IR, HOMA-IR, homeostasis model assessment index of insulin resistance; LDL-C, low-density lipoprotein-cholesterol; n, number; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; WHR, waist-to-height ratio; WHR, waist-to-hip ratio. Normal ranges of biochemical parameters that reached statistical significance: FG: 3.9–5.6 mmol l⁻¹; TC: 3.7–5.2 mmol l⁻¹; LDL-C < 3.34 mmol l⁻¹; ALT < 0.83 µkat l⁻¹.

controls (15.5 vs 13.1 years, $P < 0.001$).¹⁶ In our study, infected children were significantly taller than those uninfected in spite of the same age span. This finding was also demonstrated in all infected girls and infected obese girls. It has recently been shown that human adenoviruses attached to the host cells use cell surface receptors for forward signaling, which can activate cell growth and intracellular transport.²⁹ However, further studies are required to determine whether this general mechanism may be responsible for the observed increased height in adolescents infected with Adv36.

An association of Adv36 infection with lipid profile has been documented in several studies.^{5,7,11,15} In the total population of children in our study, Adv36-positive children exhibited higher levels of TC and LDL-C than did Adv36-negative children, although neither of these lipids was outside of the normal range. When obese and overweight children were analyzed separately, the association of elevated lipids and Adv36-positive status was not confirmed. This finding is in line with the results of Almgren *et al.*,⁷ in which blood lipid levels did not differ between Adv36-positive compared with Adv36-negative Swedish overweight/obese children. On the other hand, in the study of Korean children, obese Adv36-positive children had significantly elevated levels of TG, TC and LDL-C in comparison to those uninfected.¹⁵ In the Korean study, no association of Adv36 status with lipids was found in the non-obese group.¹⁵ We cannot explain the diverse findings in these different studies. We do not have puberty status of our children, but we analyzed each age group by year and did not find any differences in the lipid patterns. Future studies should evaluate the effect of puberty.

Levels of fasting blood glucose were significantly lower in Adv36-positive in contrast to Adv36-negative subjects in our study. This trend was shown in all weight categories but did not reach a significant level except for the obese group. In published studies of children, no association of Adv36 status to blood glucose has been found.^{7,14,15} Studies carried out in Adv36-infected animals showed that Adv36 infection enhanced insulin sensitivity and improved hepatic steatosis.^{18,19} As others, we did not demonstrate any relation of Adv36 seropositivity to insulin or insulin resistance.^{7,9,10} We also failed to find any relationship between Adv36 seropositivity and adiponectin levels, although according to Rogers *et al.*³⁰ Adv36 upregulates an expression of adiponectin in human adipose tissue *in vitro*. A relationship of Adv36 seropositivity and hepatic steatosis was documented in animal models and Italian adults.^{9,19} A study of 84 Korean children did not show any association to liver enzymes.¹⁴ In our study, only infected boys, regardless of body weight, demonstrated significantly higher activities of liver enzymes (but not above the normal range) compared with Adv36-negative boys. Further studies performed in children are necessary to clarify this association.

In conclusion, our results support an association of Adv36 antibodies with obesity and an even stronger association with overweight. In our total population, Adv36 antibodies were related to increased body weight, body height z-score, BMI, hip circumference, total body fat and trunk fat, levels of TC and LDL-C, but decreased levels of blood glucose. Female subjects had a higher prevalence of Adv36 positivity in all weight categories and infected female subjects demonstrated significantly higher waist circumference as well as the above differences.

CONFLICT OF INTEREST

Dr R Atkinson is the owner and Dr Z Lee is Laboratory Director of Obetech, LLC, a company that provides assays for adenoviruses associated with obesity and has several patents in the area of virus-induced obesity. Dr Atkinson also is Co-Editor of the *International Journal of Obesity*. Dr IA Hainerová, Dr H Zamrazilová, Dr L Dušátková, Dr B Sedláčková, Dr P Hlavatý, Dr M Kunešová and Dr V Hainer declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the grant: NT/13792-4 Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic.

REFERENCES

- Lobstein T, Baur L, Uauy R. IASO International Obesity Task Force. Obesity in children and young people: a crisis in public health. *Obes Rev* 2004; **5**(Suppl 1): 4–104.
- McAllister EJ, Dhurandhar NV, Keith SW, Aronne LJ, Barger J, Baskin M *et al*. Ten putative contributors to the obesity epidemic. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2009; **49**: 868–913.
- Dhurandhar NV. Infectobesity: obesity of infectious origin. *J Nutr* 2001; **131**: 2794S–2797S.
- Pasarica M, Mashtalir N, McAllister EJ, Kilroy GE, Koska J, Permana P *et al*. Adipogenic human adenovirus Ad-36 induces commitment, differentiation, and lipid accumulation in human adipose-derived stem cells. *Stem Cells* 2008; **26**: 969–978.
- Atkinson RL, Dhurandhar NV, Allison DB, Bowen RL, Israel BA, Albu JB *et al*. Human adenovirus AD-36 is associated with increased body weight and paradoxical reduction of serum lipids. *Int J Obes (Lond)* 2005; **29**: 281–286.
- Yamada T, Hara K, Kadowaki T. Association of adenovirus 36 infection with obesity and metabolic markers in humans: a meta-analysis of observational studies. *PLoS One* 2012; **7**: e42031.
- Almgren M, Atkinson R, He J, Hilding A, Hagman E, Wolk A *et al*. Adenovirus-36 is associated with obesity in children and adults in Sweden as determined by rapid ELISA. *PLoS One* 2012; **7**: e41652.
- Atkinson RL. Prevalence of infection with adenovirus-36 in Belgium and Holland and association with obesity. *Obesity (Silver Spring, MD)* 2011; **19**: 2.
- Trovato GM, Castro A, Tonzuso A, Garozzo A, Martines GF, Pirri C *et al*. Human obesity relationship with Ad36 adenovirus and insulin resistance. *Int J Obes (Lond)* 2009; **33**: 1402–1409.
- Trovato GM, Martines GF, Garozzo A, Tonzuso A, Timpanaro R, Pirri C *et al*. AD36 adipogenic adenovirus in human non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2010; **30**: 184–190.
- Na HN, Kim J, Lee HS, Shim KW, Kimm H, Jee SH *et al*. Association of human adenovirus-36 in overweight Korean adults. *Int J Obes (Lond)* 2012; **36**: 281–285.
- Goossens VJ, deJager SA, Grauls GE, Gielen M, Vlietinck RF, Derom CA *et al*. Lack of evidence for the role of human adenovirus-36 in obesity in a European cohort. *Obesity (Silver Spring, MD)* 2011; **19**: 220–221.
- Broderick MP, Hansen CJ, Irvine M, Metzgar D, Campbell K, Baker C *et al*. Adenovirus 36 seropositivity is strongly associated with race and gender, but not obesity, among US military personnel. *Int J Obes (Lond)* 2010; **34**: 302–308.
- Atkinson RL, Lee I, Shin HJ, He J. Human adenovirus-36 antibody status is associated with obesity in children. *Int J Pediatr Obes* 2010; **5**: 157–160.
- Na HN, Hong YM, Kim J, Kim HK, Jo I, Nam JH. Association between human adenovirus-36 and lipid disorders in Korean schoolchildren. *Int J Obes (Lond)* 2010; **34**: 89–93.
- Gabbert C, Donohue M, Arnold J, Schwimmer JB. Adenovirus 36 and obesity in children and adolescents. *Pediatrics* 2010; **126**: 721–726.
- Dhurandhar NV, Israel BA, Kolesar JM, Mayhew G, Cook ME, Atkinson RL. Transmissibility of adenovirus-induced adiposity in a chicken model. *Int J Obes* 2001; **25**: 990–996.
- Trovato GM, Martines GF, Trovato FM, Pirri C, Pace P, Garozzo A *et al*. Adenovirus-36 seropositivity enhances effects of nutritional intervention on obesity, bright liver, and insulin resistance. *Dig Dis Sci* 2012; **57**: 535–544.
- Trovato GM, Martines GF, Garozzo A, Tonzuso A, Timpanaro R, Pirri C *et al*. AD36 adipogenic adenovirus in human non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2010; **30**: 184–190.
- Kobzova J, Vignerova J, Blaha P, Krejcovsky L, Riedlova J. The 6th nationwide anthropological survey of children and adolescents in the Czech Republic in 2001. *Cent Eur J Public Health* 2004; **12**: 126–130.
- Report of a WHO Expert Committee. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1995; **854**: 429–431.
- Bergman RN, Stefanovski D, Buchanan TA, Sumner AE, Reynolds JC, Sebring NG *et al*. A better index of body adiposity. *Obesity (Silver Spring, MD)* 2011; **19**: 1083–1089.
- Haas GM, Liepold E, Schwandt P. Percentile curves for fat patterning in German adolescents. *World J Pediatr* 2011; **7**: 16–23.
- Zamrazilová H, Hlavatý P, Dušátková L, Sedláčková B, Aldhoon Hainerová I, Kunešová M *et al*. A new simple method for estimating trunk and visceral fat by bioelectrical impedance: comparison with magnetic resonance imaging and dual X-ray absorptiometry in Czech adolescents. *Cas Lek Cesk* 2010; **149**: 417–422.
- National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescent. The fourth report on the diagnosis,

- evaluation and treatment of high blood pressure in children and adolescents. *Pediatrics* 2004; **114**: 555–576.
- 26 Chapman SJ, Hill AVS. Human genetic susceptibility to infectious disease. *Nat Rev Genet* 2012; **13**: 175–188.
- 27 James CB, Vanderpool EA, Roane P. Acceleration of adenovirus replication and increased virion production by treatment with the steroid hormone 17 beta-estradiol. *Microbiol Immunol* 1992; **36**: 99–103.
- 28 Vindrieux D, Le Corre L, Hsieh JT, Métivier R, Escobar P, Caicedo A *et al*. Cxsackie and adenovirus receptor is a target and a mediator of estrogen action in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2011; **18**: 311–321.
- 29 Wolfrum N, Greber UF. Adenovirus signalling in entry. *Cell Microbiol* 2013; **15**: 53–62.
- 30 Rogers PM, Mashtalir N, Rathod MA, Dubuisson O, Wang Z, Dasuri K *et al*. Metabolically favorable remodeling of human adipose tissue by human adenovirus type 36. *Diabetes* 2008; **57**: 2321–2331.

4.5 Infekce adenovirem 36: role v dietním příjmu a úspěšnosti lázeňského redukčního programu u obézních dívek

Autoři: Zamrazilová H., Aldhoon-Hainerová I., Atkinson R.L., Dušátková L., Sedláčková B., Lee Z.P., Kunešová M., Hill M., Hainer V.

International journal of obesity (Lond) 2015, 39(12):1757–1760. IF = 5,004

Abstrakt: Asociace infekce Adv36 s nadváhou a obezitou u dětí byla potvrzena, avšak vliv Adv36 na úspěšnost redukčního programu dosud nebyl zkoumán. Cílem práce bylo sledovat změny v energetickém příjmu a tělesných parametrech u 184 dívek, které absolvovaly 4týdenní redukční pobyt s ohledem na přítomnost protilátek proti Adv36. Dietní příjem se nelišil mezi dívkami s pozitivními a negativními protilátkami proti Adv36. Po intervenčním programu pozitivní dívky vykazovaly větší pokles obvodu pasu ($p = 0,020$), WHR ($p = 0,007$) a poměru hmotnosti k výšce ($p = 0,019$) oproti dívkám bez protilátek proti Adv36. Tyto dívky měly naopak vyšší pokles sumy kožních řas ($p = 0,013$) ve srovnání s Adv36 pozitivními dívkami. Ostatní sledované parametry (metabolické a hormonální ukazatele) zůstaly před a po intervenci nezměněny. Zdá se, že Adv36 pozitivní dívky jsou úspěšnější v redukci abdominální obezity a naopak méně úspěšné v redukci podkožního tuku než dívky bez protilátek.

U této práce jsem se podílela na sběru a analýze dat a revizi manuskriptu.

SHORT COMMUNICATION

Adenovirus 36 infection: a role in dietary intake and response to inpatient weight management in obese girls

H Zamrazilová^{1,5}, I Aldhoon-Hainerová^{1,2,5}, RL Atkinson³, L Dušátková^{1,4}, B Sedláčková^{1,4}, ZP Lee³, M Kunešová¹, M Hill¹ and V Hainer¹

Human adenovirus 36 (Adv36) increases adiposity and is more prevalent in overweight and obese children. Dietary intake in animal models is comparable regardless of Adv36 status. The effects of Adv36 on obesity treatment outcomes have not been clarified. The aim of this study is to investigate the pre-treatment dietary intake and the response to a 4-week inpatient weight management in 184 obese adolescent girls aged 13.0–17.9 years with respect to the presence of Adv36 antibodies. Evaluation of 3-day dietary records did not show any difference in daily intake of energy and essential nutrients between Adv36 antibody positive and negative girls. After the intervention Adv36 positive girls presented with significantly greater decrease of waist circumference ($P=0.020$), z-score of waist circumference ($P=0.024$), waist-to-hip ratio ($P=0.007$) and weight-to-height ratio ($P=0.019$) compared with Adv36 negative girls. On the contrary, the sum of four skinfolds decreased significantly more in Adv36 negative than in Adv36 positive individuals ($P=0.013$). Neither body fat percentage nor metabolic and hormonal parameters showed any significant relevance to Adv36 status in response to weight loss intervention. In conclusion, energy restriction in Adv36 antibody positive girls was associated with greater decrease of abdominal obesity and preservation of subcutaneous fat tissue than in those antibody negative.

International Journal of Obesity advance online publication, 22 September 2015; doi:10.1038/ijo.2015.167

INTRODUCTION

Overweight and obesity in adolescents are associated with several health risks.¹ Treatment modalities related to pediatric obesity are very limited and successful long-term weight management outcome in adolescents is often difficult to achieve.² Among overweight and obese children, inpatient short-term weight management programs reduce cardiovascular risk factors and improve fitness.³ The response to weight management treatment may significantly differ among obese individuals, and thus several studies have tried to identify predictors of weight loss in response to weight management programs.^{4,5} Apart from individual genetic background, other factors possibly play a role. Adenovirus 36 (Adv36) in humans is associated with greater adiposity and is more prevalent in overweight and obese than in normal-weight individuals.⁶ Dietary intake in animal models is similar between Adv36 antibody positive and negative individuals.^{7,8} No data on dietary intake in humans with respect to the presence of Adv36 antibodies are available. Until now, only three reports with inconsistent results have investigated the impact of Adv36 infection on weight intervention, with the maximum of 73 studied subjects.^{9–11} The aim of our study was to evaluate the role of Adv36 in dietary intake before and in response to a short-term inpatient weight management program.

MATERIALS AND METHODS

A cohort of 184 Czech obese girls (mean age of 14.89 years, 95% confidence interval: lower 14.67 and upper 15.10; body mass index

(BMI) ≥ 97 th percentile for sex and age of the Czech reference) underwent a 4-week inpatient weight management program. In brief, the weight management program was provided on an inpatient basis in a center specialized in weight management for children/adolescents within a period of 4 weeks and was strictly medically supervised (pediatricians, dietitians, physiotherapists and psychologists). Adolescents had aerobic exercise 3.5–4.0 h per day (for example, jumping, jogging, ball games, fitness, swimming, dancing and hiking 4–10 km per day). Screen time was limited to a maximum of 1 h a day. The decreased daily energy intake (to 5–7 MJ per day) was individually modified according to age and BMI in order to ensure the recommended daily consumption of all essential nutrients and appropriate macronutrient balance. The intake of fat, protein and carbohydrates was aimed at 30%, 15–20% and 50–55% of energy intake, respectively; sugar intake was $\leq 5\%$ of total energy intake. The weight loss was mainly achieved due to the increased physical activity.

Weight management outcomes were evaluated according to the presence of Adv36 antibodies that were assayed using a previously described competitive enzyme-linked immunosorbent assay.¹² In all girls dietary intakes (total energy (kilojoules per day), macronutrients—carbohydrate, fat and protein (grams per day and percentage of total energy intake), fiber (grams per day) and calcium (milligrams per day)) were calculated from 3-day dietary records performed before the initiation of the intervention. NutriMaster SE versions 1.0 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) was applied. Dietary records with incomplete data were not included in the pre-treatment dietary intake assessment.

¹Obesity Management Center, Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic; ²Department of Pediatrics and Center for Research of Diabetes, Metabolism and Nutrition, Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic; ³Virginia Obesity Research Institute, Richmond, VA, USA and ⁴Faculty of Science, Department of Molecular and Cell Biology, Genetics and Virology & Department of Biochemistry, Charles University, Prague, Czech Republic. Correspondence: Dr I Aldhoon-Hainerová, Obesity Management Center, Institute of Endocrinology, Národní 8, Prague 1, 11694, Czech Republic.

E-mail: ihainer@hotmail.com

⁵These authors contributed equally to this work.

Received 26 January 2015; revised 17 July 2015; accepted 3 August 2015; accepted article preview online 25 August 2015

Before and after the weight intervention, the following parameters were investigated: anthropometry—body height; body weight; waist, hip and arm circumferences and their z-scores; sum of biceps, triceps, subscapular and suprailliac skinfolds; trunk and total body fat assessed by bioimpedance; indexes—BMI and its z-score, weight-to-height ratio, waist-to-hip ratio, body adiposity index, centrality (subscapular-to-triceps) index and homeostasis model assessment insulin resistance index; clinical evaluation (blood pressure) and fasting biochemical and hormonal measurements (blood glucose, insulin, lipid profile, liver function tests, C-reactive protein, adiponectin, adipsin, ghrelin, glucose-dependent insulinotropic peptide, glucagon-like peptide 1, glucagon, leptin, plasminogen activator inhibitor-1, resistin and visfatin). A description of anthropometric procedures, laboratory assays and evaluations has previously been published.¹³ The prevalence of metabolic syndrome defined according to the International Diabetes Federation in relation to Adv36 antibody status was assessed before and after the inpatient weight management program.¹⁴

The differences of all the parameters before and after the program were calculated. In order to assess the impact of Adv36 on weight management outcomes, the percentage of change related to baseline value was compared between Adv36 positive and negative groups. The original data were transformed by power transformation to attain a constant variance and symmetric distribution of data and residuals, and the data underwent general linear model analysis. Statgraphics Centurion version XV.II (Warrenton, VA, USA) was used.

All participants and their parent(s) signed an informed consent before the initiation of study procedures. The study protocol was

approved by the Ethical Committee of the Institute of Endocrinology in Prague and was in accordance with the Helsinki Declaration II.

RESULTS

Of the total, 65 girls (35.3%) screened positive for Adv36 antibodies. There was no significant difference in self-reported dietary intakes between Adv36 positive and negative obese girls before the initiation of weight management (Table 1). In response to a 1-month weight management program, the mean weight loss of 5.36 kg (5.01; 5.71) was achieved in Adv36 antibody positive and 5.45 kg (5.18; 5.71) in Adv36 antibody negative girls. Table 2 presents BMI status at baseline and those parameters that either showed significant change after the weight management program or are somewhat relevant to those significant findings. Adv36 positive girls showed significantly greater decrease of waist circumference, z-score of waist circumference, weight-to-height ratio and waist-to-hip ratio compared with Adv36 negative girls. On the contrary, the sum of four skinfolds decreased significantly more in Adv36 negative than in Adv36 positive individuals. There was a tendency of the z-score BMI of Adv36 positive girls decreasing to a greater extent than that of seronegative girls. None of the further studied parameters showed any significant relevance to Adv36 status in response to the inpatient weight management program. At baseline, the prevalence of metabolic syndrome was 14.9% in Adv36 negative and 10.7% in positive girls. After the 4-week intervention, the prevalence declined to 9.9% in seronegative and to 5.4% in seropositive girls. Neither at the beginning nor at the end of the weight loss intervention did the

Table 1. Self-reported dietary intake in obese girls based on the presence of Adv36 antibodies

| | Before weight management | | P-value |
|------------------------------------------------|--------------------------|-------------------|---------|
| | Adv36 – n = 88 | Adv36+ n = 53 | |
| Total energy intake (kJ) | 7482 (7182; 7797) | 7230 (6862; 7622) | 0.474 |
| Carbohydrate intake (g per day) | 227 (217; 237) | 217 (204; 230) | 0.393 |
| Fat intake (g per day) | 71 (68; 74) | 68 (64; 73) | 0.439 |
| Protein intake (g per day) | 67 (64; 70) | 64 (60; 68) | 0.342 |
| Carbohydrate intake (% of total energy intake) | 50 (49; 51) | 50 (49; 52) | 0.637 |
| Fat intake (% of total energy intake) | 35 (34; 36) | 35 (34; 36) | 0.837 |
| Protein intake (% of total energy intake) | 15 (14; 15) | 15 (14; 15) | 0.971 |
| Fiber (g per day) | 11 (10; 11) | 11 (10; 12) | 0.715 |
| Calcium (mg per day) | 700 (660; 744) | 641 (594; 692) | 0.205 |

Abbreviation: Adv36, adenovirus 36. Data are presented as retransformed means, lower and upper confidence intervals.

Table 2. Anthropometric variables before and their changes after the inpatient weight management program in obese girls related to the presence of Adv36 antibodies

| | Before weight management | | | Percentage change related to baseline | | |
|----------------------------|--------------------------|-------------------------|---------|---------------------------------------|-------------------------|---------|
| | Adv36 – n = 119 | Adv36+ n = 65 | P-value | Adv36 – n = 119 | Adv36+ n = 65 | P-value |
| BMI (kg m ⁻²) | 32.02 (31.52; 32.53) | 30.62 (29.97; 31.28) | 0.021 | -6.55 (-6.81; -6.28) | -6.81 (-7.15; -6.45) | 0.413 |
| BMI z-score | 2.90 (2.83; 2.96) | 2.76 (2.67; 2.85) | 0.076 | -10.69 (-11.40; -9.99) | -12.69 (-13.65; -11.72) | 0.082 |
| Waist (cm) | 90.90 (89.85; 91.97) | 89.11 (87.75; 90.50) | 0.153 | -4.11 (-4.49; -3.72) | -5.21 (-5.75; -4.68) | 0.020 |
| Waist z-score | 2.25 (2.14; 2.37) | 2.11 (1.96; 2.28) | 0.328 | -19.37 (-21.48; -17.32) | -25.38 (-28.53; -22.35) | 0.024 |
| Hip (cm) | 112.27 (111.10; 113.45) | 109.93 (108.37; 111.49) | 0.096 | -3.96 (-4.23; -3.68) | -3.55 (-3.91; -3.18) | 0.210 |
| Hip z-score | 2.63 (2.54; 2.74) | 2.49 (2.36; 2.62) | 0.229 | -17.28 (-18.71; -15.88) | -17.78(-19.71; -15.90) | 0.767 |
| WHR | 0.81 (0.81; 0.82) | 0.81 (0.80; 0.82) | 0.920 | -0.22 (-0.66; 0.22) | -1.68 (-2.29; -1.08) | 0.007 |
| WHRr | 0.56 (0.55; 0.56) | 0.55 (0.54; 0.55) | 0.128 | -4.11 (-4.50; -3.73) | -5.22 (-5.75; -4.69) | 0.019 |
| Sum of four skinfolds (mm) | 98.01 (95.97; 100.14) | 90.85 (88.45; 93.37) | 0.003 | -15.90 (-17.42; -14.39) | -11.36 (-13.38; -9.34) | 0.013 |
| Body fat (%) | 43.63 (40.47; 46.89) | 40.17 (36.19; 44.32) | 0.355 | -5.54 (-6.20; -4.88) | -5.91 (-6.75; -5.08) | 0.625 |

Abbreviations: Adv36, adenovirus 36; BMI, body mass index; Hip, hip circumference; Waist, waist circumference; WHR, waist-to-hip ratio; WHRr, weight-to-hip ratio. Data are described as retransformed mean, lower and upper confidence intervals.

prevalence of metabolic syndrome significantly differ between and within the groups according Adv36 status.

DISCUSSION

Our intervention study of 184 obese girls is so far the largest study of Adv36 status with respect to weight loss and the first study to report dietary intake in humans in relation to Adv36 infection. Similar to the observations in animal models,^{7,8} no significant difference in dietary intake between Adv36 positive and negative girls was detectable. An inaccuracy of self-reported dietary intake, especially in obese individuals, is well known.^{15,16} We are aware of the non-trivial errors associated with self-reported estimates of energy intake, and some authors in these articles believe it is an inadequate measure for the basis of scientific conclusion.^{15,17} With the aim of completeness, however, we included information on energy and macronutrient intake and do not use it as a basis for scientific conclusion, rather as a means to explore the differences between individuals infected with Adv36 and those who are not, and to identify areas for further research. On the other hand, there is no reason to believe that the presence of Adv36 antibodies would alter the pattern of reporting. In our analyses, only obese subjects in whom similar level of underreporting may be expected were compared. Thus, the absence of a difference in energy and macronutrient intake of Adv36 positive vs negative subjects in this study supports the animal data reported by multiple other authors.^{7,8} Finally, a recent article has provided some data in support of the validity of dietary recall of energy intake in young children.¹⁸ That study clearly demonstrated only a modest difference (86 kcal per day) between energy intake and total energy expenditure measured by doubly labeled water even in overweight/obese children.

Adv36 seropositivity in obese girls undergoing a 4-week inpatient weight management program was associated with greater decrease of abdominal fat, but at the same time with preservation of subcutaneous fat. Knowing this, we would expect a better metabolic profile in antibody positive individuals after the intervention. We did not find any differences in laboratory parameters between the two groups according to the presence of Adv36 antibodies either before or after the intervention.

Several human studies, mostly performed in adults, have shown that Adv36 infection is associated with better glycemic control and lipid profile, lower glycosylated hemoglobin, higher insulin sensitivity and lower hepatic lipid content.^{10,19–22} In our previous study of 1179 adolescents, we showed that Adv36 positivity was related to decreased level of blood glucose in both genders and increased liver enzymes only in boys.¹² In that study, we did not confirm any association of Adv36 infection with insulin resistance, lipid profile and liver enzyme activity, which is in agreement with findings of several other investigators.^{6,12,23–25} So far, there has not been a study in children and adolescents supporting the evidence of a protective role of Adv36 in insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease. It is questionable whether those studies conducted in small pediatric cohorts due to rather low incidence of these obesity-related complications were statistically powered to prove this possible relationship. Larger studies performed in metabolically unhealthy adolescents thus would be helpful.

On the basis of Adv36 antibody status, we did not find a significant difference in weight loss expressed by z-score of BMI, which is in line with a recent study of 73 youths.⁹ As in our study visceral fat decreased more and subcutaneous fat less, it may have obscured a difference in total weight. We may further speculate that the lack of significant association of Adv36 infection with weight loss in our study may be due to an insufficient duration of intervention as shown by Trovato et al.¹¹ in a year-long study that Adv36 positive individuals lost more weight than Adv36 negative

individuals.¹⁰ The most recent study of a 2-month exercise program in 54 children has concluded that Adv36 infection probably contributes to weight-loss resistance.

We are aware that our pilot study has several limitations, including short-time duration, an absence of sophisticated body composition assessment and lack of data in boys. Because of a low number of Adv36 antibody positive boys (19 of 111 boys), we did not achieve sufficient statistical power to perform valid analyses. Larger studies performed in both genders over a longer period of time are needed to elucidate the impact of Adv36 on weight loss.

We conclude that no differences in self-reported dietary intake between Adv36 antibody positive and negative obese girls were apparent. Energy restriction in Adv36 antibody positive girls was associated with greater decrease of abdominal obesity and preservation of subcutaneous adipose tissue than in those who were antibody negative.

CONFLICT OF INTEREST

RLA is the owner of Obetech, LLC, a company that provides assays for adenoviruses that produce obesity and has several patents for diagnostic assays and vaccines in the area of virus-induced obesity. RLA is a Co-Editor of the *International Journal of Obesity*. The remaining authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by NT/13792-4 Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic.

REFERENCES

- Weiss R, Dziura J, Burgert TS, Tamborlane WV, Taksali SE, Yeckel CW et al. Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N Engl J Med* 2004; **350**: 2362–2374.
- Reinehr T, Widhalm K, l'Allemand D, Wiegand S, Wabitsch M, Holl RW et al. Two-year follow-up in 21,784 overweight children and adolescents with lifestyle intervention. *Obesity (Silver Spring)* 2009; **17**: 1196–1199.
- Huelsing J, Kanafani N, Mao J, White NH. Camp jump start: effects of a residential summer weight-loss camp for older children and adolescents. *Pediatrics* 2010; **125**: e884–e890.
- Hainer V, Hlavatá K, Gojová M, Kunesová M, Wagenknecht M, Kopský V et al. Hormonal and psychobehavioral predictors of weight loss in response to a short-term weight reduction program in obese women. *Physiol Res* 2008; **57**: S17–S27.
- Uysal Y, Wolters B, Knop C, Reinehr T. Components of the metabolic syndrome are negative predictors of weight loss in obese children with lifestyle intervention. *Clin Nutr* 2014; **33**: 620–625.
- Atkinson RL, Lee I, Shin HJ, He J. Human adenovirus-36 antibody status is associated with obesity in children. *Int J Pediatr Obes* 2010; **5**: 157–160.
- Pasarica M, Shin AC, Yu M, Ou Yang HM, Rathod M, Jen KL et al. Human adenovirus 36 induces adiposity, increases insulin sensitivity, and alters hypothalamic monoamines in rats. *Obesity (Silver Spring)* 2006; **14**: 1905–1913.
- Dhurandhar NV, Israel BA, Kolesar JM, Mayhew GF, Cook ME, Atkinson RL. Increased adiposity in animals due to a human virus. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; **24**: 989–996.
- Vander Wal JS, Huelsing J, Dubuisson O, Dhurandhar NV. An observational study of the association between adenovirus 36 antibody status and weight loss among youth. *Obes Facts* 2013; **6**: 269–278.
- Trovato GM, Martines GF, Trovato FM, Pirri C, Pace P, Garozzo A et al. Adenovirus-36 seropositivity enhances effects of nutritional intervention on obesity, bright liver, and insulin resistance. *Dig Dis Sci* 2012; **57**: 535–544.
- Na HN, Hong YM, Ye MB, Park S, Kim IB, Nam JH. Adenovirus 36 attenuates weight loss from exercise but improves glycemic control by increasing mitochondrial activity in the liver. *PLoS One* 2014; **9**: e114534.
- Aldhoon-Hainerová I, Zamrazilová H, Atkinson RL, Dušátková L, Sedláčková B, Hlavatý P et al. Clinical and laboratory characteristics of 1179 Czech adolescents evaluated for antibodies to human adenovirus 36. *Int J Obes (Lond)* 2014; **38**: 285–291.
- Aldhoon-Hainerová I, Zamrazilová H, Dušátková L, Sedláčková B, Hlavatý P, Hill M et al. Glucose homeostasis and insulin resistance: prevalence, gender differences and predictors in adolescents. *Diabetol Metab Syndr* 2014; **6**: 100.

- 14 Zimmet P, Alberti KG, Kaufman F, Tajima N, Silink M, Arslanian S *et al*. The metabolic syndrome in children and adolescents – an IDF consensus report. *Pediatr Diabetes* 2007; **8**: 299–306.
- 15 Schoeller DA, Thomas D, Archer E, Heymsfield SB, Blair SN, Goran MI *et al*. Self-report-based estimates of energy intake offer an inadequate basis for scientific conclusions. *Am J Clin Nutr* 2013; **97**: 1413–1415.
- 16 Lichtman SW, Pisarska K, Berman ER, Pestone M, Dowling H, Offenbacher E *et al*. Discrepancy between self-reported and actual caloric intake and exercise in obese subjects. *N Engl J Med* 1992; **327**: 1893–1898.
- 17 Dhurandhar NV, Schoeller D, Brown AW, Heymsfield SB, Thomas D, Sørensen TI *et al*. Energy balance measurement: when something is not better than nothing. *Int J Obes (Lond)* 2015; **39**: 1109–1113.
- 18 Böhmhorst C, Bel-Serrat S, Pigeot I, Huybrechts I, Ottavaere C, Sioen I *et al*. Validity of 24-h recalls in (pre-)school aged children: comparison of proxy-reported energy intakes with measured energy expenditure. *Clin Nutr* 2014; **33**: 79–84.
- 19 Lin WY, Dubuisson O, Rubicz R, Liu N, Allison DB, Curran JE *et al*. Long-term changes in adiposity and glycemic control are associated with past adenovirus infection. *Diabetes Care* 2013; **36**: 701–707.
- 20 Krishnapuram R, Dhurandhar EJ, Dubuisson O, Kirk-Ballard H, Bajpeyi S, Butte N *et al*. Template to improve glycemic control without reducing adiposity or dietary fat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; **300**: E779–E789.
- 21 Rogers PM, Mashtalir N, Rathod MA, Dubuisson O, Wang Z, Dasuri K *et al*. Metabolically favorable remodeling of human adipose tissue by human adenovirus type 36. *Diabetes* 2008; **57**: 2321–2331.
- 22 Atkinson RL, Dhurandhar NV, Allison DB, Bowen RL, Israel BA, Albu JB *et al*. Human adenovirus-36 is associated with increased body weight and paradoxical reduction of serum lipids. *Int J Obes (Lond)* 2005; **29**: 281–286.
- 23 Almgren M, Atkinson R, He J, Hilding A, Hagman E, Wolk A *et al*. Adenovirus-36 is associated with obesity in children and adults in Sweden as determined by rapid ELISA. *PLoS One* 2012; **7**: e41652.
- 24 Trovato GM, Castro A, Tonzuso A, Garozzo A, Martines GF, Pirri C *et al*. Human obesity relationship with Ad36 adenovirus and insulin resistance. *Int J Obes (Lond)* 2009; **33**: 1402–1409.
- 25 Trovato GM, Martines GF, Garozzo A, Tonzuso A, Timpanaro R, Pirri C *et al*. AD36 adipogenic adenovirus in human non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2010; **30**: 184–190.

4.6 Asociace infekce adenovirem 36 s variantami kandidátních genů pro obezitu u adolescentů

Autoři: Dušátková L., Zamrazilová H., Aldhoon-Hainerová I., Atkinson R.L., Sedláčková B., Lee Z.P., Včelák J., Bendlová B., Kunešová M., Hainer V.

Physiological Research 2015; 64 (Suppl. 2): S197–S202. IF = 1,293

Abstrakt: Vzájemný vztah genových polymorfismů a infekce Adv36, které se podílejí na patogenezi obezity, nebyl dosud zkoumán. Cílem předkládané práce bylo analyzovat potenciální souvislost mezi 10 variantami genů *TMEM18*, *SH2B1*, *KCTD15*, *PCSK1*, *BDNF*, *SEC16B*, *MC4R* a *FTO* s přítomností protilátek proti Adv36 u 1 027 adolescentů. Přítomnost protilátek byla významně častěji nalezena u nosičů rizikových alel polymorfismů rs6232 a rs6235 *PCSK1* a rs4923461 *BDNF* ($\chi^2 = 6,59$, $p = 0,010$; $\chi^2 = 7,56$, $p = 0,023$ a $\chi^2 = 6,84$, $p = 0,033$) oproti nenosičům. V případě rs6232, resp. rs6235 genu *PCSK1* bylo rovněž potvrzeno zvýšené riziko infekce Adv36 (OR = 1,67; 95% CI 1,11–2.49; $p = 0,016$; resp. OR = 1,34; 95%CI 1,08–1,67; $p = 0,010$). Při analýzách zohledňujících vliv pohlaví a tělesné hmotnosti byla pozorována asociace Adv36 s polymorfismy rs6232 *PCSK1* u chlapců ($\chi^2 = 5,09$; $p = 0,024$), rs925946 *BDNF* u dívek ($\chi^2 = 7,29$; $p = 0,026$) a rs6235 *PCSK1* u chlapců a dívek s nadváhou a obezitou ($\chi^2 = 6,85$; $p = 0,033$). Výsledky pilotní studie naznačují, že varianty genů *PCSK1* a *BDNF* mohou ovlivňovat náchylnost k infekci Adv36.

U této práce jsem se podílela na sběru a analýze dat, vyhodnocování výsledků a sepsání manuskriptu.

Association of Adenovirus 36 Infection With Obesity-Related Gene Variants in Adolescents

L. DUŠÁTKOVÁ^{1,2}, H. ZAMRAZILOVÁ¹, I. ALDHOON HAINEROVÁ^{1,3},
R. L. ATKINSON⁴, B. SEDLÁČKOVÁ^{1,2}, Z. P. LEE⁴, J. VČELÁK¹, B. BENDLOVÁ¹,
M. KUNEŠOVÁ¹, V. HAINER¹

¹Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic, ²Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic, ³Department of Pediatrics and Center for Research of Diabetes, Metabolism and Nutrition, Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic, ⁴Virginia Obesity Research Institute, Richmond, VA, USA

Received July 13, 2015

Accepted July 28, 2015

Summary

Both, common gene variants and human adenovirus 36 (Adv36) are involved in the pathogenesis of obesity. The potential relationship between these two pathogenic factors has not yet been investigated. The aim of our study was to examine the association of obesity susceptibility loci with Adv36 status. Genotyping of ten gene variants (in/near *TMEM18*, *SH2B1*, *KCTD15*, *PCSK1*, *BDNF*, *SEC16B*, *MC4R*, *FTO*) and analysis of Adv36 antibodies was performed in 1,027 Czech adolescents aged 13.0-17.9 years. Variants of two genes (*PCSK1* and *BDNF*) were associated with Adv36 seropositivity. A higher prevalence of Adv36 antibody positivity was observed in obesity risk allele carriers of *PCSK1* rs6232, rs6235 and *BDNF* rs4923461 vs. non-carriers ($\chi^2=6.59$, $p=0.010$; $\chi^2=7.56$, $p=0.023$ and $\chi^2=6.84$, $p=0.033$, respectively). The increased risk of Adv36 positivity was also found in *PCSK1* variants: rs6232 (OR=1.67, 95 % CI 1.11-2.49, $p=0.016$) and rs6235 (OR=1.34, 95 % CI 1.08-1.67, $p=0.010$). *PCSK1* rs6232 and *BDNF* rs925946 variants were closely associated with Adv36 status in boys and girls, respectively ($\chi^2=5.09$, $p=0.024$; $\chi^2=7.29$, $p=0.026$). Furthermore, *PCSK1* rs6235 risk allele was related to Adv36 seropositivity ($\chi^2=6.85$, $p=0.033$) in overweight/obese subgroup. In conclusion, our results suggest that obesity risk variants of *PCSK1* and *BDNF* genes may be related to Adv36 infection.

Key words

Adolescence • Obesity • Genome-wide association • Single nucleotide polymorphism • Adenovirus 36

Corresponding author

L. Dusatkova, Obesity Management Center, Institute of Endocrinology, Národní 8, 116 94 Prague 1, Czech Republic. Fax: +420 224 905 325. E-mail: ldusatkova@gmail.com

Introduction

The prevalence of obesity in children and adolescents remains high despite numerous recent attempts to improve strategies in prevention and treatment (Ahluwalia *et al.* 2015, Ahrens *et al.* 2014). Novel insights into the multifactorial pathogenesis of obesity have, however, been made during the last decade. The genome-wide association study (GWAS) approach has identified a number of common variants related to body mass index (BMI) and obesity. Several associations have been replicated in various populations, including in children and adolescents (den Hoed *et al.* 2010, Neale *et al.* 2015). A total of 97 gene variants (56 novel) were described by the latest GWAS in 2015 (Locke *et al.* 2015). Variations have been mostly found in or near unknown genes whose function and impact on body weight regulation still need to be elucidated (Locke *et al.* 2015). The role of human adenovirus 36 (Adv36) in the pathogenesis of obesity was first documented in experimental animal models (Dhurandhar *et al.* 2000). Adv36 infection induces adipogenesis by promoting proliferation and differentiation of preadipocytes and by increasing lipid accumulation in adipocytes (Pasarica *et al.* 2008). An association of Adv36 with increased body

weight in humans has clearly been confirmed over the last decade (Aldhoon-Hainerova *et al.* 2014, Atkinson *et al.* 2005, Shang *et al.* 2014). An important role of genetic factors in susceptibility to various infectious diseases has been demonstrated by family studies and multiple GWAS (Chapman and Hill 2012). Additionally, an impaired immunity in obesity (Tanaka *et al.* 1993) leads to a greater susceptibility to different infections (Karlsson *et al.* 2010). If the pathogenesis of obesity is partly mediated by infectious agents we may speculate whether there is a relationship between obesity susceptibility gene loci and Adv36 infection.

The aim of our study was to investigate the association of ten previously reported gene variants associated with BMI and obesity with Adv36 seropositivity and their relation to gender and body weight in Czech adolescents.

Methods

Subjects

A study population consisted of 1,027 Czech adolescents aged 13.0-17.9 years (476 boys and 551 girls; of them 540 were normal weight and 487 overweight/obese) who were selected from the original Childhood Obesity Prevalence and Treatment project (Aldhoon-Hainerova *et al.* 2014). Only those with complete data on anthropometric parameters, genotypes and Adv36 antibody assessment were included in the present study. All participants and their parent(s) signed an informed consent before the initiation of study procedures. The study protocol was approved by the Ethical Committee of the Institute of Endocrinology in Prague and was in accordance with the Helsinki declaration II.

Anthropometric assessment

Body height, body weight, BMI and its z-score were assessed as described previously (Aldhoon-Hainerova *et al.* 2014). Overweight and obesity was defined as BMI \geq 90th percentile according to the Czech BMI references specified for sex and age (Kobzova *et al.* 2004).

Genotyping

Ten single nucleotide polymorphisms (SNPs) – rs7561317 (transmembrane protein 18 gene, *TMEM18*), rs7498665 (SH2B adaptor protein 1 gene, *SH2B1*), rs29941 (potassium channel tetramerisation domain

containing 15 gene, *KCTD15*), rs6232 and rs6235 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 gene, *PCSK1*), rs925946 and rs4923461 (brain-derived neurotrophic factor gene, *BDNF*), rs10913469 (SEC16 homolog B *S. cerevisiae* gene, *SEC16B*), rs17782313 (melanocortin 4 receptor gene, *MC4R*) and rs9939609 (fat mass and obesity associated gene, *FTO*) were studied. SNPs in both the *PCSK1* (rs6232, rs6235) and the *BDNF* (rs925946, rs4923461) were analyzed separately due to their incomplete linkage (Dusatkova *et al.* 2013). Genotyping was performed using the TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) on a Biomark (Fluidigm, South San Francisco, CA, USA) and LightCycler 480 (Roche, Basel, Switzerland) and described in detail by Dusatkova *et al.* (2013). In the present study all SNPs followed the Hardy-Weinberg equilibrium (evaluated by chi-square test, $p > 0.05$).

Adv36 antibody assessment

The detection of Adv36 antibodies from serum was done by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay developed by Obetech, LLC (Richmond, VA, USA).

Statistical analyses

Characteristics of Adv36 negative and Adv36 positive groups were compared using chi-squared test for descriptive variables and nonparametric Mann-Whitney test for quantitative variables (expressed as medians with lower and upper quartiles). Chi-squared tests and odds ratios (ORs) were calculated to determine associations of Adv36 seropositivity with genotypes and alleles, respectively. Analyses with genotypes were performed in the whole cohort as well as in subgroups stratified by gender and body weight. When the number of minor homozygotes was less than five, they were combined with heterozygotes for such a genotype. Statistical software NCSS 2004 (NCSS, LLC, Kaysville, UT, USA) was used. P-value (two-tailed) < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Of the total 1,027 adolescents, 26.4 % presented with positive Adv36 antibodies. The basic characteristics of the cohort based on Adv36 antibody status are shown in Table 1. A significantly higher prevalence of Adv36 antibody positivity was found in girls as compared to

boys (Table 1). Genotype distributions and risk allele frequencies according to Adv36 status are presented in Table 2. Obesity risk allele carriers of *PCSK1* rs6232, *PCSK1* rs6235 and *BDNF* rs4923461 had significantly higher prevalence of Adv36 positivity than non-carriers (Table 2). Also the other *BDNF* variant rs925946 had a borderline association with Adv36 infection (Table 2). Furthermore, both minor alleles of *PCSK1* increased chances of having positive Adv36 antibodies (Table 2). Analyses taking into account gender revealed a higher prevalence of Adv36 positivity in males carrying risk *PCSK1* rs6232 ($\chi^2=5.09$, $p=0.024$) and in females carrying risk allele *BDNF* rs925946 ($\chi^2=7.29$, $p=0.026$). When stratified by body weight, the relation of *PCSK1* rs6235 with Adv36 was confirmed in the overweight/obese subgroup ($\chi^2=6.85$, $p=0.033$).

Table 1. Characteristics of the study population according to the presence of Adv36 antibodies.

| Characteristics | Adv36- | Adv36+ | p |
|----------------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| All (n=1027) | 756 (73.6%) | 271 (26.4%) | |
| <i>Boys/girls</i> | 383/373 | 93/178 | <0.001 ^a |
| <i>Age (years)</i> | 15.7 (14.5; 16.8) | 15.8 (14.7; 16.9) | 0.445 ^b |
| <i>BMI z-score</i> | 0.5 (-0.1; 2.6) | 1.5 (0.1; 2.8) | 0.027 ^b |
| <i>Overweight</i> | 333 (44.1%) | 154 (56.8%) | <0.001 ^a |
| Boys (n=476) | 383 (80.5%) | 93 (19.5%) | |
| <i>Age (years)</i> | 15.6 (14.4; 16.7) | 15.9 (15.1; 16.9) | 0.134 ^b |
| <i>BMI z-score</i> | 0.5 (0; 2.6) | 1.3 (0.1; 2.7) | 0.227 ^b |
| <i>Overweight</i> | 171 (44.7%) | 50 (53.8%) | 0.114 ^a |
| Girls (n=551) | 373 (67.7%) | 178 (32.3%) | |
| <i>Age (years)</i> | 15.9 (14.8; 16.9) | 15.7 (14.6; 17) | 0.560 ^b |
| <i>BMI z-score</i> | 0.5 (-0.1; 2.7) | 1.6 (0; 2.8) | 0.082 ^b |
| <i>Overweight</i> | 162 (43.4%) | 104 (58.4%) | 0.001 ^a |

Quantitative data are described as medians (lower; upper quartiles). ^a p-values were derived from chi-squared tests, ^b from Mann-Whitney tests. Adv36-, adenovirus 36 antibody negative; Adv36+, adenovirus 36 antibody positive; BMI, body mass index.

Discussion

Our association study of 1,027 Czech adolescents is the first to investigate the relationship between obesity susceptibility loci and Adv36 antibody status. As all identified GWAS loci are able to explain not more than 2.7% of variation in BMI and their predictive value is low (Locke *et al.* 2015), an elucidation of these mostly unknown genes in pathophysiology of obesity could be

valuable. Of ten examined gene variants, variants of two genes showed some relation to the presence of Adv36 antibodies. The obesity risk alleles rs6232 and rs6235 of *PCSK1* and rs4923461 of *BDNF* were associated with a higher prevalence of Adv36 seropositivity in both genders regardless of body weight. The same tendency was observed for rs925946 of *BDNF* but only in girls. *PCSK1* encodes a protease from the subtilisin-like proprotein convertase family that process polypeptide hormones and neuropeptide precursors (Jansen *et al.* 1995). The rs6232 variant encodes a substitution N221D that reduces catalytic activity of the protease and leads to obesity, while the rs6235 (S690T) had no effect on catalytic activity (Benzinou *et al.* 2008). *BDNF*, a member of the nerve growth factor family essential for survival of striatal neurons in the brain, is involved in hypothalamic regulation of energy balance through the leptin-melanocortin signaling pathway (Nicholson *et al.* 2007). Both, rs4923461 and rs925946 are intergenic variants localized within the *BDNF* antisense non-coding transcript. It was shown that inhibition of this transcript upregulates *BDNF* mRNA (Modarresi *et al.* 2012), thus we could speculate that examined *BDNF* variants influence *BDNF* expression and consequently energy homeostasis. The minor allele of *PCSK1* rs6235 was significantly more prevalent in Adv36 positive overweight/obese subgroup, but not in normal weight counterparts. In obese subjects, particularly in those extremely obese, a more severe course of infectious diseases has been shown (Almond *et al.* 2013, Garcia *et al.* 2015). An association between obesity risk alleles and Adv36 seropositivity may partly be due to a greater susceptibility of obese individuals to infection. In addition, the combined effect of Adv36 infection with obesity risk genotype in the development of obesity should also be considered. An expression of *PCSK1* and *BDNF* is mainly situated to hypothalamic regions and mutations in these genes cause rare monogenic forms of early onset obesity (Hinney *et al.* 2014). The adipogenic effect of Adv36 studied in rats was also confirmed in the central nervous system (Pasarica *et al.* 2006). Moreover, Adv36 reduces leptin production (Vangipuram *et al.* 2007). Until now we may only speculate if these gene variants influence the susceptibility to Adv36 infection and consequently body weight. Nevertheless, we would point out the important role of genetic susceptibility as well as the role of Adv36 infection in body weight regulation. The major limitation of our study is the size of our cohort, which may not be sufficiently powered to detect low effects of common gene variants.

Table 2. Associations of ten gene variants with the presence of Adv36 antibodies.

| Variant | Genotypes (n) | | | RAF (%) | χ^2 p | OR (95 % CI) p |
|---------------------------------|---------------|-----|-----|---------|---------------|----------------------------|
| | AA | AG | GG | | | |
| <i>TMEM18</i> rs7561317 | Adv36- | 13 | 202 | 541 | 84.9 | 0.79 (0.61; 1.03) 0.095 |
| | Adv36+ | 7 | 85 | 179 | 81.7 | |
| <i>SH2B1</i> rs7498665 | Adv36- | 254 | 375 | 127 | 41.6 | 1.11 (0.91; 1.35) 0.338 |
| | Adv36+ | 91 | 121 | 59 | 44.1 | |
| <i>KCTD15</i> rs29941 | Adv36- | 72 | 339 | 345 | 68.1 | 0.94 (0.76; 1.15) 0.571 |
| | Adv36+ | 32 | 117 | 122 | 66.6 | |
| <i>PCSK1</i> rs6232 | Adv36- | 2 | 65 | 689 | 4.6 | 1.67 (1.11; 2.49) 0.016 |
| | Adv36+ | 1 | 38 | 232 | 7.4 | |
| <i>PCSK1</i> rs6235 | Adv36- | 427 | 291 | 38 | 24.3 | 1.34 (1.08; 1.67) 0.010 |
| | Adv36+ | 131 | 117 | 23 | 30.1 | |
| <i>BDNF</i> rs925946 | Adv36- | 387 | 315 | 54 | 28.0 | 1.16 (0.93; 1.43) 0.202 |
| | Adv36+ | 135 | 104 | 32 | 31.0 | |
| <i>BDNF</i> rs4923461 | Adv36- | 484 | 225 | 47 | 78.9 | 1.17 (0.91; 1.50) 0.247 |
| | Adv36+ | 176 | 89 | 6 | 81.4 | |
| <i>SEC16B</i> rs10913469 | Adv36- | 24 | 233 | 499 | 18.6 | 1.05 (0.82; 1.35) 0.735 |
| | Adv36+ | 10 | 85 | 176 | 19.4 | |
| <i>MC4R</i> rs17782313 | Adv36- | 63 | 295 | 398 | 27.8 | 0.99 (0.80; 1.23) 0.985 |
| | Adv36+ | 19 | 112 | 140 | 27.7 | |
| <i>FTO</i> rs9939609 | Adv36- | 162 | 385 | 209 | 46.9 | 1.16 (0.95; 1.41) 0.157 |
| | Adv36+ | 68 | 138 | 65 | 50.6 | |

Chi-squared tests (χ^2) were performed among genotypes, odds ratios (OR) between alleles. ^a Minor homozygotes and heterozygotes were combined. Adv36-, adenovirus 36 antibody negative; Adv36+, adenovirus 36 antibody positive; CI, confidence interval; RAF, risk allele frequency.

In conclusion, our results suggest that obesity susceptibility loci of *PCSK1* and *BDNF* genes may be related to the status of Adv36 antibodies and consequently to body weight. However, to validate our findings, further investigations in larger cohorts are required.

Conflict of Interest

Dr. R. Atkinson is the owner and Dr. Z. Lee is Laboratory Director of Obetech, LLC, a company that provides assays for adenoviruses that produce obesity and has

several patents for diagnostic assays and vaccines in the area of virus-induced obesity. Dr. Atkinson is a Co-Editor of the International Journal of Obesity. L. Dušátková, H. Zamrazilová, I. Aldhoon Hainerová, B. Sedláčková, J. Včelák, B. Bendlová, M. Kunešová and V. Hainer declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This study was supported by NT/13792-4 Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic.

References

- AHLUWALIA N, DALMASSO P, RASMUSSEN M, LIPSKY L, CURRIE C, HAUG E, KELLY C, DAMSGAARD MT, DUE P, TABAK I, ERCAN O, MAES L, AASVEE K, CAVALLO F: Trends in overweight prevalence among 11-, 13- and 15-year-olds in 25 countries in Europe, Canada and USA from 2002 to 2010. *Eur J Public Health* **25** (Suppl 2): 28-32, 2015.
- AHRENS W, PIGEOT I, POHLABELN H, DE HENAUW S, LISSNER L, MOLNAR D, MORENO LA, TORNARITIS M, VEIDEBAUM T, SIANI A: Prevalence of overweight and obesity in European children below the age of 10. *Int J Obes (Lond)* **38** (Suppl 2): S99-S107, 2014.
- ALDHOON-HAINEROVA I, ZAMRAZILOVA H, ATKINSON RL, DUSATKOVA L, SEDLACKOVA B, HLA VATY P, LEE ZP, KUNESOVA M, HAINER V: Clinical and laboratory characteristics of 1179 Czech adolescents evaluated for antibodies to human adenovirus 36. *Int J Obes (Lond)* **38**: 285-291, 2014.
- ALMOND MH, EDWARDS MR, BARCLAY WS, JOHNSTON SL: Obesity and susceptibility to severe outcomes following respiratory viral infection. *Thorax* **68**: 684-686, 2013.
- ATKINSON RL, DHURANDHAR NV, ALLISON DB, BOWEN RL, ISRAEL BA, ALBU JB, AUGUSTUS AS: Human adenovirus-36 is associated with increased body weight and paradoxical reduction of serum lipids. *Int J Obes (Lond)* **29**: 281-286, 2005.
- BENZINO M, CREEMERS JW, CHOQUET H, LOBBENS S, DINA C, DURAND E, GUERARDEL A, BOUTIN P, JOURET B, HEUDE B, BALKAU B, TICHET J, MARRE M, POTOCZNA N, HORBER F, LE STUNFF C, CZERNICHOW S, SANDBAEK A, LAURITZEN T, BORCH-JOHNSEN K, ANDERSEN G, KIESS W, KORNER A, KOVACS P, JACOBSON P, CARLSSON LM, WALLEY AJ, JORGENSEN T, HANSEN T, PEDERSEN O, MEYRE D, FROGUEL P: Common nonsynonymous variants in PCSK1 confer risk of obesity. *Nat Genet* **40**: 943-945, 2008.
- CHAPMAN SJ, HILL AV: Human genetic susceptibility to infectious disease. *Nat Rev Genet* **13**: 175-188, 2012.
- DEN HOED M, EKELUND U, BRAGE S, GRONTVED A, ZHAO JH, SHARP SJ, ONG KK, WAREHAM NJ, LOOS RJ: Genetic susceptibility to obesity and related traits in childhood and adolescence: influence of loci identified by genome-wide association studies. *Diabetes* **59**: 2980-2988, 2010.
- DHURANDHAR NV, ISRAEL BA, KOLESAR JM, MAYHEW GF, COOK ME, ATKINSON RL: Increased adiposity in animals due to a human virus. *Int J Obes Relat Metab Disord* **24**: 989-996, 2000.
- DUSATKOVA L, ZAMRAZILOVA H, SEDLACKOVA B, VCELAK J, HLA VATY P, ALDHOON HAINEROVA I, KORENKOVA V, BRADNOVA O, BENDLOVA B, KUNESOVA M, HAINER V: Association of obesity susceptibility gene variants with metabolic syndrome and related traits in 1,443 Czech adolescents. *Folia Biol* **59**: 123-133, 2013.
- GARCIA MN, PHILPOTT DC, MURRAY KO, ONTIVEROS A, REVELL PA, CHANDRAMOHAN L, MUNOZ FM: Clinical predictors of disease severity during the 2009-2010 A(H1N1) influenza virus pandemic in a paediatric population. *Epidemiol Infect*: 1-11, 2015.
- HINNEY A, VOLCKMAR AL, ANTEL J: Genes and the hypothalamic control of metabolism in humans. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **28**: 635-647, 2014.
- JANSEN E, AYOUBI TA, MEULEMANS SM, VAN DE VEN WJ: Neuroendocrine-specific expression of the human prohormone convertase 1 gene. Hormonal regulation of transcription through distinct cAMP response elements. *J Biol Chem* **270**: 15391-15397, 1995.
- KARLSSON EA, SHERIDAN PA, BECK MA: Diet-induced obesity impairs the T cell memory response to influenza virus infection. *J Immunol* **184**: 3127-3133, 2010.
- KOBZOVA J, VIGNEROVA J, BLAHA P, KREJCOVSKY L, RIEDLOVA J: The 6th nationwide anthropological survey of children and adolescents in the Czech Republic in 2001. *Cent Eur J Public Health* **12**: 126-130, 2004.
- LOCKE AE, KAHALI B, BERNDT SI, JUSTICE AE, PERS TH, DAY FR, POWELL C, VEDANTAM S, BUCHKOVICH ML, YANG J, CROTEAU-CHONKA DC, ESKO T, FALL T, FERREIRA T, GUSTAFSSON S, KUTALIK Z, LUAN J, MAGI R, RANDALL JC, WINKLER TW, WOOD AR, WORKALEMAHU T, FAUL JD, SMITH JA, HUA ZHAO J, ZHAO W, CHEN J, FEHRMANN R, ET AL.: Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature* **518**: 197-206, 2015.

- MODARRESI F, FAGHIHI MA, LOPEZ-TOLEDANO MA, FATEMI RP, MAGISTRI M, BROTHERS SP, VAN DER BRUG MP, WAHLESTEDT C: Inhibition of natural antisense transcripts in vivo results in gene-specific transcriptional upregulation. *Nat Biotechnol* **30**: 453-459, 2012.
- NEAD KT, LI A, WEHNER MR, NEUPANE B, GUSTAFSSON S, BUTTERWORTH A, ENGERT JC, DAVIS AD, HEGELE RA, MILLER R, DEN HOED M, KHAW KT, KILPELAINEN TO, WAREHAM N, EDWARDS TL, HALLMANS G, VARGA TV, KARDIA SL, SMITH JA, ZHAO W, FAUL JD, WEIR D, MI J, XI B, QUINTEROS SC, COOPER C, SAYER AA, JAMESON K, GRONTVED A, FORNAGE M, ET AL.: Contribution of common non-synonymous variants in PCSK1 to body mass index variation and risk of obesity: a systematic review and meta-analysis with evidence from up to 331 175 individuals. *Hum Mol Genet* **24**: 3582-3594, 2015.
- NICHOLSON JR, PETER JC, LECOURT AC, BARDE YA, HOFBAUER KG: Melanocortin-4 receptor activation stimulates hypothalamic brain-derived neurotrophic factor release to regulate food intake, body temperature and cardiovascular function. *J Neuroendocrinol* **19**: 974-982, 2007.
- PASARICA M, SHIN AC, YU M, OU YANG HM, RATHOD M, JEN KL, MOHANKUMAR S, MOHANKUMAR PS, MARKWARD N, DHURANDHAR NV: Human adenovirus 36 induces adiposity, increases insulin sensitivity, and alters hypothalamic monoamines in rats. *Obesity (Silver Spring)* **14**: 1905-1913, 2006.
- PASARICA M, MASHTALIR N, McALLISTER EJ, KILROY GE, KOSKA J, PERMANA P, DE COURTEN B, YU M, RAVUSSIN E, GIMBLE JM, DHURANDHAR NV: Adipogenic human adenovirus Ad-36 induces commitment, differentiation, and lipid accumulation in human adipose-derived stem cells. *Stem Cells* **26**: 969-978, 2008.
- SHANG Q, WANG H, SONG Y, WEI L, LAVEBRATT C, ZHANG F, GU H: Serological data analyses show that adenovirus 36 infection is associated with obesity: a meta-analysis involving 5739 subjects. *Obesity (Silver Spring)* **22**: 895-900, 2014.
- TANAKA S, INOUE S, ISODA F, WASEDA M, ISHIHARA M, YAMAKAWA T, SUGIYAMA A, TAKAMURA Y, OKUDA K: Impaired immunity in obesity: suppressed but reversible lymphocyte responsiveness. *Int J Obes Relat Metab Disord* **17**: 631-636, 1993.
- VANGIPURAM SD, YU M, TIAN J, STANHOPE KL, PASARICA M, HAVEL PJ, HEYDARI AR, DHURANDHAR NV: Adipogenic human adenovirus-36 reduces leptin expression and secretion and increases glucose uptake by fat cells. *Int J Obes (Lond)* **31**: 87-96, 2007.

4.7 Gen pro FTO a jeho role v genetické determinaci obezity – editorial

Autoři: Dušátková L., Hainer V.

Vnitřní Lékařství 2012; 58(3):177–178. IF = 0

Článek je editorialem publikaci autorů D. Dlouhé a J. A. Hubáčka „Gen pro FTO a jeho role v genetické determinaci obezity“ (Vnitř Lék 2012; 58(3):208–215). Doplnuje další zajímavé informace z oblasti výzkumu genu *FTO*, například popsany vztah polymorfismů genu *FTO* se strukturálními a objemovými změnami mozkové tkáně a vyšším rizikem Alzheimerovy choroby.

U této práce jsem se podílela na interpretaci dat a sepsání manuskriptu.

Gen pro *FTO* a jeho role v genetické determinaci obezity – editorial

L. Dušátková, V. Hainer

Endokrinologický ústav Praha, ředitelka RNDr. Běla Bendlová, CSc.

Dlouhá D et al. Gen pro *FTO* a jeho role v genetické determinaci obezity. Vnitř Lék 2012; 58(3): 208–215.

V tomto čísle časopisu Vnitřní lékařství vychází článek Mgr. Dany Dlouhé a Ing. Jaroslava Hubáčka, CSc., o genu *FTO* a jeho roli v genetické determinaci obezity. Jedná se o velmi aktuální téma nejen v oblasti obezitologie, ale celkově ve výzkumu polygenně dědičných chorob. Článek shrnuje dosavadní poznatky o genu *FTO*, zejména je pak zaměřen na vztah polymorfizmů tohoto genu k různým fenotypovým charakteristikám a komplikacím obezity.

Gen *FTO* (fat mass and obesity associated) byl jako kandidátní gen pro obezitu poprvé označen v roce 2007 na základě celogenomové asociační studie (Genome-Wide Association Study – GWAS) [1]. Asociace polymorfizmů v 1. intronu tohoto genu s fenotypem nadváhy a obezity byla následně potvrzena mnoha asociačními studii, a to na dospělé i dětské populaci [2]. Do dnešního dne byla provedena celá řada studií, které se zaměřovaly na sledování vztahu rizikových alel genu *FTO* k velmi širokému rozpětí parametrů. Kromě vztahů uvedených v článku Dlouhé a Hubáčka byly publikovány další zajímavé poznatky a náhledy na působení genu *FTO*, na něž je vhodné upozornit.

Pozoruhodný pohled přináší práce zaměřená na nalezení souvislostí mezi polymorfizmy genu *FTO* a objemem mozkové tkáně [3]. Autoři reagovali na známý a hojně popisovaný vztah jed-

nak mezi genem *FTO* a BMI (Body Mass Index) [1,4], ale rovněž mezi BMI a regionálními strukturálními změnami mozkové tkáně [5,6]. U 206 zdravých seniorů byla provedena genotypizace a vyšetření magnetickou rezonancí. Studie opravdu prokázala redukcii objemu mozkové tkáně (8% redukce u čelního laloku, 12% u okcipitálního laloku) u nosičů rizikových alel *FTO* oproti nenosičům. Rovněž prokázala nezávislý vliv BMI na objem mozkové tkáně. Závěry studie tedy mohou přispět k lepšímu pochopení vlivu genetických faktorů na vývoj a funkci centrální nervové soustavy, což je významné s ohledem na stoupající prevalenci neurodegenerativních onemocnění, např. Alzheimerovy choroby. Vliv výživy, zejména malnutrice, a pohybové aktivity na rozvoj kognitivních poruch u seniorů byl široce zkoumán [7]. Asociaci obezity k Alzheimerově chorobě prokázala studie jedinců ve věku nad 65 let. Byl zjištěn vztah centrální obezity ke zvýšenému riziku rozvoje Alzheimerovy choroby v tomto věku [8]. Objasnit vliv genu *FTO* přímo k Alzheimerově chorobě a riziku demence se pokusil Keller et al [9]. Bylo sledováno 1 000 jedinců po dobu 9 let a výsledky poukázaly na fakt, že nositelé rizikového genotypu AA pro polymorfismus rs9939609 genu *FTO* mají ve srovnání s homozygoty TT vyšší riziko Alzheimerovy choroby a že toto riziko ještě zvyšovala přítomnost

APOE. Další studie prokázala vztah mezi genem *FTO* a běžnými duševními poruchami [10]. Nicméně tuto spojitost se podařilo prokázat pouze u mužské populace. Nedávná studie u starých mužů prokázala, že nositelé rizikové alely genu *FTO*, pokud byly obézní nebo měli nadváhu, vykazovali nižší schopnost plynulé verbální komunikace. Tento vliv nebyl prokázán s ohledem na všeobecnou kognitivní schopnost, což ukazuje na to, že gen *FTO* působí na kognitivní procesy u starších mužů primárně v oblasti frontálního laloku [11].

Naprostojedinečlá je rovněž studie, která se zaměřila na vztah polymorfizmů genu *FTO* a katarakty [12]. Příčiny katarakty nejsou dosud plně objasněny. Je zvažován také vliv obezity, nicméně výsledky studií jsou dosud rozporuplné. Autoři předkládají výsledky populační studie asijských dospělých mužů. Obezita byla asociovaná se zvýšeným rizikem rozvoje kortikální a zadní subkapsulární katarakty, nicméně nosičství rizikové alely genu *FTO* bylo asociovaná s rozvojem katarakty nukleární. Studie tedy překvapivě poukázala na možné zapojení genu *FTO* v patogenezi nukleární katarakty, která nebyla asociovaná s obezitou.

V práci Dlouhé a Hubáčka je diskutován vztah genu *FTO* k diabetu 2. typu a kardiometabolickým onemocněním. Za doplnění jistě stojí také informace

o vztahu genu *FTO* k dyslipidemii a k hypertenzi. Studie Doney et al prokázala asociaci rizikové alely genu *FTO* s diabetem 2. typu a infarktem myokardu a také s aterogenním lipidovým profilem – nižší plazmatickou hladinou HDL-cholesterolu, zvýšenými triglyceridy a zvýšeným aterogenním indexem [13]. V naší studii prováděné jak u reprezentativního vzorku českých adolescentů, tak u adolescentů s nadváhou a obezitou jsme zjistili souvislost rizikové alely genu *FTO* s obezitou a s množstvím trunkálního tuku. Souvislost s vyšší koncentrací triglyceridů a s nižší hladinou HDL-cholesterolu byla nalezena pouze u dívek s nadváhou a obezitou. Nicméně asociaci rizikového genotypu s metabolickým syndromem se nám v této věkové kategorii nepodařilo prokázat [14]. Kanadská studie provedená u adolescentů poukázala u nosičů rizikového genotypu *FTO* nejen na zvýšené množství celkového tuku, ale i na významné zmožení intraabdominálního tuku a vyšší systolický krevní tlak. Maximální rozdíly ve výši krevního tlaku byly zaznamenány v odpověď na mentální stres a přítomnost rizikové alely byla spojena s vyšším indexem vazomotorického sympatického tonu [15]. Tonus sympatiku je významně regulován v paraventrikulárním a dorzolaterálním jádře hypotalamu, což jsou též oblasti, ve kterých je prokazována vysoká exprese genu *FTO* [16]. Nicméně je předmětem diskuzí, jak dalece je vliv genu *FTO* na rozvoj diabetu 2. typu a hypertenze nezávislý na BMI, resp. na zmožení intraabdominálního tuku. Vliv genu *FTO* na krevní tlak a diabetes 2. typu se podle některých studií po adjustaci na BMI oslabuje, nebo zcela mizí [15,17]. Je třeba zmínit také možné interakce polymorfizmů genu *FTO* s dalšími geny, asociovanými s obezitou, např. s genem *MC4R* (melanocortin 4 receptor). Kombinovaný vliv rizikových variant genů *FTO* a *MC4R* byl zkoumán v evropské populaci zahrnující téměř 8 000 dospělých a dospívajících jedinců. Nositelé rizikových alel obou genů měli již v dětství 3krát vyšší náchylnost k rozvoji obezity než jedinci,

kterí nositeli těchto alel nebyli. V dospělosti byl tento kombinovaný vliv méně výrazný, zvyšoval riziko obezity 1,8krát [18]. I když je účinek genů *FTO* a *MC4R* na obezitu a diabetes 2. typu aditivní, s ohledem na krevní tlak mohou některé varianty genu *MC4R* působit opačně než varianty genu *FTO*. Porucha funkce genu *MC4R* je spojena s nižším krevním tlakem, s nižší prevalencí hypertenze a je důsledkem snížené aktivity sympatického nervového systému [19].

Gen *FTO* patří bezesporu ke genům, které se významně podílejí na patogenezi obezity a přidružených onemocněních. Studium vlivu tohoto genu ve velkých populačních skupinách přináší jistě cenné poznatky. Nicméně je třeba vzít v úvahu, že sledování asociací tohoto genu s antropometrickými a klinickými parametry může být mnohdy zavádějící, pokud nebere v úvahu vliv etnika, pohlaví, věku, fyzické aktivity a dietních zvyklostí zkoumané populace [18,20–22].

Podpořeno grantem NT 12342-5/2011, grantem 7F08077 z MSMT ČR a grantem z Norska prostřednictvím Norského finančního mechanismu (CZ 0123).

Literatura

1. Fraying 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.
2. Hinney A, Vogel CI, Hebebrand J. From monogenic to polygenic obesity: recent advances. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2010; 19: 297–310.
3. Ho AJ, Stein JL, Hua X et al. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. A commonly carried allele of the obesity-related *FTO* gene is associated with reduced brain volume in the healthy elderly. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 8404–8409.
4. 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.
5. Takii Y, Kinomura S, Sato K et al. Relationship between body mass index and gray matter volume in 1,428 healthy individuals. *Obesity (Silver Spring)* 2008; 16: 119–124.
6. Raji CA, Ho AJ, Parikshak NN et al. Brain structure and obesity. *Hum Brain Mapp* 2010; 31: 353–364.
7. Matějovská Kubešová H, Meluzinová H, Weber P. Faktory ovlivňující vznik a průběh kognitivních poruch u seniorů. *Vnitř Lék* 2011; 57: 502–506.
8. Luchsinger JA, Cheng D, Tang MX et al. Central Obesity in the Elderly is Related to Late-onset Alzheimer Disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2011 Jun 9.

9. 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: 461–469.

10. Kivimäki M, Jokela M, Hamer M et al. Examining overweight and obesity as risk factors for common mental disorders using fat mass and obesity-associated (*FTO*) genotype-instrumented analysis: The Whitehall II Study, 1985–2004. *Am J Epidemiol* 2011; 173: 421–429.

11. 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: 1159.e1–e5.

12. Lim LS, Tai ES, Aung T et al. Relation of age-related cataract with obesity and obesity genes in an Asian population. *Am J Epidemiol* 2009; 169: 1267–1274.

13. 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.

14. Dusatkova L, Zamrazilova H, Sedlackova B et al. Association of the *FTO* variant rs9939609 with metabolic syndrome in overweight/obese and representative cohorts of Czech adolescents. *Int J Obes* 2011; 35 (Suppl 1): S11.

15. Pausova Z, Syme C, Abrahamowicz M et al. A common variant of the *FTO* gene is associated with not only increased adiposity but also elevated blood pressure in French Canadians. *Circ Cardiovasc Genet* 2009; 2: 260–269.

16. 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.

17. Mangge H, Renner W, Almer G et al. Rs9939609 variant of the fat mass and obesity-associated gene and trunk obesity in adolescents. *J Obes* 2011; 2011: 186368.

18. Cauchi S, Stutzmann F, Cavalcanti-Proença C et al. Combined effects of *MC4R* and *FTO* common genetic variants on obesity in European general populations. *J Mol Med (Berl)* 2009; 87: 537–546.

19. Greenfield JR, Miller JW, Keogh JM et al. Modulation of blood pressure by central melanocortinergic pathways. *N Engl J Med* 2009; 360: 44–52.

20. Hardy R, Wills AK, Wong A et al. Life course variations in the associations between *FTO* and *MC4R* gene variants and body size. *Hum Mol Genet* 2010; 19: 545–552.

21. 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.

22. Razquin C, Marti A, Martinez JA. Evidences on three relevant obesogenes: *MC4R*, *FTO* and *PPARγ*. Approaches for personalized nutrition. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55: 136–149.

Mgr. Lenka Dušátková

www.endo.cz

e-mail: ldustatkova@endo.cz

Doručeno do redakce: 14. 9. 2011

4.8 Genetické pozadí běžných forem obezity – od studií identických dvojčat po studium kandidátních genů obezity

Autoři: Bendlová B., Lukášová P., Vaňková M., Vejražková D., Bradnová O., Včelák J., Stanická S., Zamrazilová H., Aldhoon-Hainerová I., Dušátková L., Kunešová M., Hainer V.

Časopis Lékařů Českých 2014; 153(4):193–199. IF = 0

Rešerše shrnuje dosavadní poznatky o výzkumu genetického pozadí běžných forem obezity od studií identických dvojčat po studium kandidátních genů obezity a GWAS. Kromě běžných variant genů se zabývá rovněž vzácnými variantami, polymorfismy typu copy number variants nebo epigenetickými modifikacemi a mikroRNA, které ovlivňují transkripci genů. Významnou součástí publikace je také přehled výsledků u české dospělé i dětské populace, včetně hodnocení genetického vlivu na úspěšnost hmotnostní redukce.

U této práce jsem se podílela na interpretaci dat a revizi manuskriptu.

Genetické pozadí běžných forem obezity – od studií identických dvojčat po studium kandidátních genů obezity*

Běla Bendlová, Petra Lukášová, Markéta Vaňková, Daniela Vejražková, Olga Bradnová, Josef Včelák, Soňa Stanická, Hana Zamrazilová, Irena Aldhoon-Hainerová, Lenka Dušátková, Marie Kunešová, Vojtěch Hainer

Endokrinologický ústav, Praha

Čas. Lék. Čes. 2014; 153: xx–xx

SOUHRN

Obezita je výsledkem interakcí mezi geny a vnějšími faktory. Míra heritability běžné obezity je 40–70 %. Nejen náchylnost k obezitě, ale např. i úspěšnost hmotnostních redukčních režimů je do značné míry dána genetickou výbavou každého člověka. Článek podává přehled současných znalostí o genetickém pozadí běžných forem obezity. Velkým přínosem pro poznání genetické determinace obezity jsou celogenomové asociační studie (GWAS), které identifikovaly asociaci 32 variant genů s body mass indexem (BMI) a 14 variant s distribucí tělesného tuku. GWAS tak díky objevu nových rizikových genů obezity přispívají i k postupnému objasňování složitých regulačních energetické rovnováhy. Přesto však nalezené varianty zdaleka nevysvětlují heritabilitu obezity, kdy se zřejmě uplatňují i další mechanismy – vzájemné interakce genů,

interakce genů s prostředím, vzácné varianty či polymorfismy typu copy number variants nebo epigenetické modifikace a mikroRNA, ovlivňující transkripci genů. Přehledně zde prezentujeme také naše práce týkající se studia genetického pozadí obezity u dětí a dospělých včetně několika studií, kdy jsme hodnotili vliv vybraných rizikových variant na úspěšnost hmotnostního redukčního režimu.

KLÍČOVÁ SLOVA

obezita – studie dvojčat – celogenomové – asociační studie – kandidátní geny – jednonukleotidové polymorfismy (SNPs) – BMI, antropometrické parametry – hmotnostní redukční režim, korelace genotyp-fenotyp

SUMMARY

Bendlová B, Lukášová P, Vaňková M, Vejražková D, Bradnová O, Včelák J, Stanická S, Zamrazilová H, Aldhoon-Hainerová I, Dušátková L, Kunešová M, Hainer V. Genetic background in common forms of obesity – from studies on identical twins to candidate genes of obesity

Common obesity is a result of interaction between genes and environmental/lifestyle factors, with heritability estimates 40–70%. Not only the susceptibility to obesity but also the success of weight management depends on the genetic background of each individual. This paper summarizes the up-to-date knowledge on genetic causes of common obesity. Introduction of genome-wide association studies (GWAS) led to an identification of a total of 32 variants associated with obesity/BMI and 14 with body fat distribution. Further, a great progress in revealing

the mechanisms regulating the energy balance was also noted. However, the proportion of explained variance for BMI is still low, suggesting the other mechanisms such as gene-gene and gene-environment interactions, rare gene variants, copy number variants polymorphisms, or epigenetic modifications and microRNAs regulating gene transcription. In summary, we present results of our studies on obesity risk variants in Czech adults, children and adolescents including those evaluating the influence of selected gene variants on the outcomes of weight management.

KEYWORDS

obesity – genome-wide association studies – candidate gene – single-nucleotide polymorphisms (SNPs) – BMI, anthropometric parameters – weight management – genotype-phenotype correlations

* Článek je věnován k 70. narozeninám doc. MUDr. Vojtěcha Hainera, CSC.

ÚVOD

Obezita a zdravotní komplikace, které jsou spojeny s nadměrným ukládáním tuku, představují celosvětově závažný zdravotní a socioekonomický problém. V současné době žije na Zemi téměř 700 milionů obézních dospělých. Pokud současný trend bude pokračovat, v roce 2030 budou na světě 1,12 miliardy lidí s obezitou (20 % světové dospělé populace) a 2,16 miliardy lidí s nadváhou (38 %) (1, 2). Alarmující je i to, že rychle přibývá i děti a mladistvých s nadváhou a obezitou, u nichž většinou obezita přetrvává do dospělosti (3). Přitom už i dětská obezita je spojena s mnoha kardiovaskulárními rizikovými faktory, jako je hypertenze, dyslipidémie, metabolický syndrom a diabetes mellitus 2. typu (4).

Ve většině studií je obezita definována na základě hodnoty BMI > 30 kg/m², nicméně BMI nepodává informaci o distribuci tuku v těle (5). Se zdravotními riziky a celkovou mortalitou asociuje spíše abdominální (centrální) obezita určená v klinické praxi a v epidemiologických studiích nejčastěji podle obvodu pasu (6, 7).

Obezita je komplexní metabolické onemocnění, které vzniká v důsledku pozitivní energetické bilance, kdy energetický příjem převládá nad energetickým výdejem. Příčinou pandemie obezity je markantní změna způsobu života spojená zejména se změnou jídelních zvyklostí (konzumace vysoce energeticky bohatých jídel) a s poklesem pohybové aktivity (1, 8). Náchylnost k obezitě je ovlivněna genetickým pozadím každého jedince. Odhaduje se, že heritabilita obezity se pohybuje mezi 40–70 % (9, 10). Obezita je tedy výsledkem interakcí mezi geny a vnějšími faktory, do značné míry danými životním stylem (11). Předpokládá se, že identifikace genetických determinant obezity pomůže najít nejen nové patogenní cesty a cíle pro farmakoterapii, ale umožní i lepší predikci onemocnění a preventivní strategie. I když přesné příčiny obezity nejsou zcela známy, důležitými etiologickými faktory jsou regulace příjmu potravy, metabolismu, či adipogeneze, které jsou silně geneticky determinovány. Běžná obezita je velmi heterogenní, multifaktoriální onemocnění s komplexním typem dědičnosti, kdy příspěvky jednotlivých rizikových genů k fenotypové variabilitě jsou velmi malé, a proto hledání genetických determinant není jednoduché.

K identifikaci rizikových genetických variant se nejprve využívalo metody studia kandidátních genů a vazebných studií. Výsledkem bylo nalezení řady genů asociovaných s obezitou, nicméně žádný z nich nebyl všeobecně validován. To bylo způsobeno různými metodologickými omezeními těchto studií, jako je malá statistická síla, nedostatek biologických a genomických znalostí aj. Jediným genem, jenž byl objeven díky kombinaci obou metod a který přestál pozdější přísnou validaci, je gen PCSK1 (12). Průlomem ve studiu genetického pozadí obezity bylo zavedení celogenomových asociačních studií (GWAS), které byly umožněny díky větší znalosti variability lidského genomu (International HapMap Consortium) a technologickému pokroku (zavedení čipových technologií – DNA arrays). Tato metoda nevyžaduje hypotézu, je založena pouze na asociaci polymorfismu se sledovaným fenotypovým znakem. Statisticky se hodnotí rozdíl ve frekvenci těchto polymorfismů mezi kohortou pacientů a kontrolních jedinců. V jedné analýze je možné genotypovat 500 000–1 600 000 jednonukleotidových polymorfismů (SNPs), které pokrývají téměř celý genom. Aby bylo dosaženo dostatečné statistické síly, soubory musejí být velmi

rozsáhlé, čítající mnoho tisíc lidí, a výsledky musejí být validovány jak nezávislými studiemi, zahrnujícími různé etnické skupiny, tak i meta-analýzami. Éra GWAS obezity začala v roce 2006 a proběhla ve čtyřech vlnách (2007–2010), kdy byly postupně objeveny geny asociující nejen s BMI, ale také s morbidní obezitou, obvodem pasu, poměrem pas/boky (WHR) a dalšími fenotypovými znaky obezity (13). Díky tomuto přístupu bylo nalezeno 43 genomických lokusů asociujících s obezitou a 18 lokusů predisponujících k viscerální akumulaci tuku, z nichž bylo celogenomově signifikantních 32 variant ovlivňujících BMI a 14 variant ovlivňujících obvod pasu/WHR. Nejvýznamnější je asociace BMI s variantami FTO, potvrzená v mnoha replikačních studiích. Relativně silné asociace s obezitou též potvrzené v nezávislých studiích včetně asijské populace jsou s geny MC4R, TMEM18, NEGR1, SH2B1, MTCH2, GNPDA2, FAIM2 a BDNF. Biologická funkce nalezených variant je předmětem intenzivního výzkumu. Většina z těchto variant totiž leží v nekódujících oblastech genomu (mezigenové oblasti či intronické varianty genů). Některé z nalezených variant mohou být kauzální (např. dosud neznámé regulační funkce apod.), jiné mohou ležet ve vazebné nerovnováze se skutečnou kauzální variantou, která však pomocí GWAS nebyla detekována. Předpokládá se, že tyto varianty spíše ovlivňují genovou transkripci než funkci příčinného genu, pro což svědčí i řada expresních studií. Většina genů asociovaných s BMI je totiž silně exprimována v centrálním nervovém systému, zatímco mnoho z genů asociujících s distribucí tuku je exprimováno spíše v periferních tkáních (14). Některé z nalezených predisponujících genů mají známou funkci, která přímo ovlivňuje obezitu. Například MC4R je důležitý v regulaci příjmu potravy, BDNF hraje roli při poruchách příjmu potravy a v tzv. odměňovacím systému, SH2B1 hraje roli v leptinové a inzulinové signalizaci, NRXN3 se také účastní odměňovacího systému, TMEM18 je zřejmě zodpovědný za neuronální vývoj, podobně i NEGR1. Některé z nalezených genů jsou specificky exprimovány v oblastech hypothalamu, kde jsou centra regulace příjmu potravy. Patří sem FTO, MTCH2, FAIM2, GNPDA2, KCTD15, ETV5 a NPC1, nicméně jejich přesná biologická funkce zatím není jasná. Geny, které ovlivňují distribuci tuku, zejména TFAP2B a LYPLAL1, jsou vysoce exprimovány přímo v tukové tkáni a jsou odpovědné za akumulaci tuků a aktivitu lipáz (13). I když bylo díky celogenomovým studiím objeveno mnoho nových lokusů asociovaných s obezitou a distribucí tuku, zdaleka nevysvětlují vysokou heritabilitu obezity. Např. riziková alela FTO (rs9939609) způsobuje zvýšení BMI pouze o 0,36 kg/m², což představuje zvýšení rizika obezity oproti nositelům této alely o 31 % (odds ratio 1,31; 95% CI (1,23–1,39)). Konsorcium GIANT odhaduje, že potvrzené varianty asociované s obezitou vysvětlují pouze 1,45 % inter-individuální variability BMI. „Chybějící“ heritabilitu mohou vysvětlit zejména přímé vzájemné interakce genů, interakce genů s prostředím, tedy s faktory životního stylu (15), např. přímé nutriční interakce s genovými variantami, či vliv fyzické aktivity na funkci a expresi některých genů aj. (16). Roli mohou hrát i jiné typy variability genomu, studovány jsou zejména vzácné varianty (frekvence alely < 5 %, resp. 1 %), či polymorfismy typu copy number variants (CNVs), tedy variabilita v opakování delších sekvencí genomu. Velkou roli budou hrát i epigenetické modifikace (metylace DNA, modifikace histonů) či mikroRNA ovlivňující transkripci genů.

NAŠE ZKUŠENOSTI – OD STUDIÍ IDENTICKÝCH DVOJČAT PO STUDIUM GENETICKÉ VARIABILITY OBEZITY

Studie monozygotních obézních dvojčat

Již v devadesátých letech 20. století doc. V. Hainer spolu s doc. M. Kunešovou a dalšími kolegy a ve spolupráci s neostorem světové obezitologie prof. Albertem Stunkardem z Pennsylvánské univerzity využili vzácného souboru obézních žen – 14 párů identických monozygotních dvojčat, aby u nich studovali míru heritability obezity a metabolických dějů s ní spojených. Sledovali nejen BMI, tělesné složení, distribuci tuku a další antropometrické parametry, ale i hormonální a metabolické ukazatele, jako např. hladiny kortizolu (17) či lipolýzu (18), složení mastných kyselin v séru a v tukové tkáni (19), klidový metabolický obrat a lačný respirační kvocient měřený pomocí nepřímé kalorimetrie, a to před a po dietetické intervenci (po týdenní stabilizaci pacientek na lůžku byla po dobu 1 měsíce podávána za hospitalizace a standardizace pohybového režimu velmi přísná nízkoenergetická dieta (VLCD – very low calorie diet; poté následoval roční redukční režim). Byly hledány i prediktory úspěšnosti redukčního režimu (20). Výstupem bylo zjištění, že je daleko významnější (až 17krát) podobnost v redukci tukové hmoty uvnitř párů než podobnost mezi páry. Bylo potvrzeno silné genetické ovlivnění nejen BMI a tělesného složení (21, 22), ale i hladin kortizolu a androgenů (23), a to jak před, tak po redukčním režimu. Identická dvojčata měla podobné i složení sérových mastných kyselin, zejména ve fosfatidylcholinové frakci. Např. i po ročním redukčním režimu byla uvnitř párů prokázána signifikantní podobnost ve složení neesenciálních i esenciálních, zejména n-3 polyneenasycených mastných kyselin v tukové tkáni, a to nezávisle na dietě, což svědčí o jejich silné genetické determinaci (24). Studie monozygotních dvojčat, která žijí odděleně, jsou nejvěrohodnějším modelem pro odhad heritability obezity a pro studium geneticky determinovaných procesů, proto tyto pionýrské publikace jsou stále velmi cenné.

Studium genetického pozadí běžné obezity u dospělých

Od devadesátých let také participujeme na výzkumu rizikových genů a jejich variant, které predisponují k běžným formám obezity. Nejprve jsme vycházeli z kandidátních genů obezity, které byly predikovány na základě jejich předpokládané biologické funkce, později z výsledků celogenomových asocičních studií, které jsme chtěli ověřit na české populaci a studovat vliv těchto rizikových variant na podrobně charakterizovaný fenotyp.

V našich studiích většinou využíváme dlouhodobě kompletné soubory dobrovolníků – pacientů a zdravých kontrol. Databáze dospělých jedinců již čítá téměř 2000 podrobně charakterizovaných jedinců. Všichni jsou vyšetřováni podle jednotného základního protokolu. Je u nich zjišťována řada anamnestických a demografických údajů, antropometrických, hormonálních a klinicko-biochemických parametrů, u nediabetických jedinců je prováděn orální glukózový toleranční test (OGTT). Antropometrické vyšetření provádí antropolog. Vyšetření je zaměřeno na základní antropometrické rozměry – tělesnou hmotnost a výšku, obvodové rozměry (pas, boky, břicho, obvod paže), kožní řasy (suprailiální, břicho, triceps, subskapulární, biceps) a tělesné složení. Pomocí bioimpedance bylo měřeno celkové procento tělesného tuku, procento tuku na trupu (Tanita) a stupeň zmnožení viscerálního tuku (ViScan).

Vzorky DNA jsou podrobovány molekulárně genetické analýze. Genotypizaci jsme nejdříve prováděli pomocí restrikční analýzy či pomocí metody polymorfismu konformace jednovláčkové DNA (SSCP) nebo sekvenačně, v poslední době prakticky výlučně pomocí TaqMan genotyping assays, a to buď na našem přístroji Real-time PCR (LC-480, Roche), nebo extenzivně na přístroji Biomark (Fluidigm) ve spolupráci s Biotechnologickým ústavem AV ČR.

Výsledky naší první pilotní studie kandidátních genů obezity byly publikovány již v roce 1997. Studovali jsme vliv mutace Trp64Arg β3-adrenergního receptoru (**ADRB3**) na tělesné složení a distribuci tuku, ale i na inzulinovou rezistenci, energetický metabolismus a lipidové spektrum. Tehdy jsme využili unikátního souboru mladých hypertoničků a kontrol, kdy frekvence mutace byla v souboru pacientů dvakrát vyšší než v kontrolním souboru. Proto jsme se rozhodli pro následnou studii, kdy podsoubor mladých mužů s různými genotypy byl podroben velmi detailní klinické charakterizaci včetně provedení euglykemického hyperinzulinemického clampu, stanovení množství a distribuce tuku (hodnoceno antropometricky a pomocí CT) a energetického metabolismu (hodnoceno nepřímou kalorimetrií). Nepotvrdili jsme však vliv této mutace ani na energetický metabolismus ani na inzulinovou rezistenci a lipidové spektrum (25, 26).

Dalším intenzivně studovaným genem byl **PPARG2** (peroxisome proliferator-activated receptor γ2), především jeho známý polymorfismus Pro12Ala (rs1801282). PPARγ2 je transkripčním faktorem, který hraje důležitou roli v diferenciaci adipocytů a v lipidovém metabolismu. Jeho přirozenými ligandy jsou volné mastné kyseliny (VMK), ale je také cílem známých inzulinových senzitivátorů thiazolidindionů. Bylo popsáno, že nositelé alely 12Ala mají vyšší inzulinovou senzitivitu, ale i tendenci přibývat na váze. V našem souboru byla frekvence alaninové alely vyšší nejen u obézních, ale i u diabetiků 2. typu a její nositelé měli signifikantně nižší hladiny lačného inzulinu (27). Zjistili jsme, že tento genotyp významně interaguje s hladinami a se složením VMK v krvi. Genotyp v interakci s hladinami VMK významně ovlivnil bazální glykémii, inzulinovou senzitivitu a sekreci inzulinu, hladiny triacylglycerolů, HDL-cholesterolu a leptinu, a to především u žen. Již dříve popisovaný protektivní vliv alely Ala na metabolismus byl pozorován jen při nízkých hladinách VMK. Nejnižší inzulinová senzitivita byla dokonce zjištěna u skupiny nositelů „protektivní alely 12Ala“, kteří však měli vysoké hladiny sérových nasycených mastných kyselin (28). Tato interakce by mohla vysvětlit různé, často protichůdné, účinky polymorfismu Pro12Ala, popisované ve vztahu k BMI, inzulinové senzitivitě nebo k diabetu 2. typu.

Vyšetřili jsme i mutaci Leu162Val (rs1800206) **PPARA** (peroxisome proliferator-activated receptor alpha), který také působí jako transkripční regulátor genů zapojených do lipidového metabolismu, a to jak u pacientů s nadváhou a obezitou, tak u normostenických osob. Asociace tohoto polymorfismu s parametry lipidového metabolismu, tělesného složení nebo psychobehaviorálními charakteristikami však potvrzeny nebyly.

Dalšími kandidátními geny obezity jsou mitochondriální odpňahující proteiny (UCP – uncoupling protein), které odpňahují aerobní fosforylacii od produkce adenosintrifosfátu (ATP), a energie oxidovaných substrátů se uvolňuje v podobě tepla. UCP tak kontrolují výdej energie. Byl studován promotorový polymorfismus A-3826C **UCPI** (rs1800592), který sni-

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

žuje transkripci genu, a vede tak ke snížení hladině tohoto proteinu, zejména v hnědé tukové tkáni. Ve skupině potomků diabetiků s genotypem AG jsme pozorovali signifikantně vyšší BMI a trend k vyššímu WHR, obvodu pasu, vyššímu procentu podkožního tuku ve srovnání s homozygoty AA. Podobná tendence byla pozorována i u kontrolní skupiny (29).

V oblasti obezitologie a diabetologie je nejzajímavějším výsledkem celogenomových asociačních studií silná asociace genu **FTO** (Fat Mass and Obesity Associated) s BMI a obezitou obecně. Funkce **FTO** v organismu není ještě zcela objasněna. Sekvenční analýzy ho zařazují do rodiny nehemových dioxigenáz, spekuluje se o jeho možném ovlivnění metylací DNA. Tento gen je vysoce exprimován v hypothalamu a podílí se zde zřejmě na regulaci energetického příjmu. Polymorfismy tohoto genu neasociují pouze s obezitou a diabetem 2. typu, ale podle nedávno publikovaných dat i např. s kardiovaskulárním onemocněním, renálním onemocněním, Alzheimerovou chorobou a řadou dalších patologií. Podle některých studií riziková varianta **FTO** genu ovlivňuje příjem potravy a výběr potravy, resp. preferenci tuků. Ne zcela jednoznačné jsou nálezy ohledně vlivu **FTO** na lipolýzu v tukových buňkách a navození rezistence k inzulinu v centrálním nervovém systému.

Ve velké studii prováděné u 1388 osob jsme již v roce 2008 zjistili, že gen **FTO**, resp. jeho intronické rizikové polymorfismy rs1121980; rs17817449; rs1421085; rs9939609 jsou velmi silně asociovány nejen s kvantitativními znaky charakterizujícími obezitu (zejména s BMI, hmotností a obvodem břicha), ale i s vyššími hladinami glukózy a leptinu v průběhu OGTT, což bylo nejvíce patrné u kontrolních zdravých žen (30).

Cílem následné studie bylo zjistit, jak se projevují varianty **FTO**, které jsou rizikové pro obezitu, u štíhlých žen. U těchto žen bylo nosičství pro obezitu rizikového haplotypu CAGA **FTO** spojeno se zvýšenými hladinami růstového hormonu. Hormonální antikoncepce významně prohloubila tyto účinky. Je možné, že právě vyšší hladiny růstového hormonu chrání tyto ženy před rozvojem obezity. Zúčastnili jsme se také velké metaanalýzy (zařazeno více než 2500 pacientek), které hodnotila dopad variant **FTO** na rozvoj obezity u pacientek se syndromem polycystických ovaríí (PCOS). Bylo zjištěno, že efekt rizikových variant **FTO** je u nich více než 2krát vyšší, než je tomu u běžné ženské populace. Pacientky, homozygotky pro rizikovou alelu polymorfismu rs9939609 měly vyšší BMI přibližně o 3,3 kg/m² a tělesnou hmotnost o 9,6 kg oproti homozygotním nositelkám wild-type alely. Z toho lze usuzovat na interakci variant **FTO** s metabolickým kontextem či polygenním pozadím PCOS (31).

Asociaci rs17817449 **FTO** s BMI publikuje u východoevropské populace i Hubáček et al. (32). V následné studii na české populaci, kdy byly soubory rekrutovány ze studií pos-MONICA a 3PMFs vyšla překvapivě asociace rizikové alely s BMI pouze u mužů a postmenopauzálních žen, nikoliv u žen premenopauzálních (33). Skupina dr. Hubáčka z IKEM studovala varianty **FTO** nejen v souvislosti s obezitou, ale i ve spojitosti s dalšími onemocněními. Autoři např. prokázali, že varianta rs17817449 ovlivňuje riziko akutního koronárního syndromu (34). Rovněž prokázali robustní asociaci též varianty s chronickým onemocněním ledvin – rizikové homozygoti GG dospěli k úplnému selhání ledvin o více než 3 roky dříve než homozygoti TT (35). Souvislost variant **FTO** s kolorektálním karcinomem, počtem krevních destiček, konzumací alkoholu či s kouřením prokázána nebyla, nicméně byla prokázána asociace polymorfismu rs17817449 se zkrácováním

telomer (ke zkrácování těchto koncových částí chromozomů dochází během stárnutí, ale v patofyziologických situacích může být spojeno i se závažnými onemocněními) (36). Jak vidno, účinky **FTO** jsou velmi komplexní a budou jistě ještě dlouho předmětem bádání.

Studovali jsme i dvě varianty receptoru pro melanokortin 4. typu (rs12970134 a rs17782313). Melanokortinový receptor 4. typu (**MC4R**) je exprimován v hypothalamu. Zprostředkovává účinek melanokortinu, kdy cestou leptinové signalizace snižuje příjem potravy a zvyšuje výdej energie. Mutace **MC4R** jsou nejčastější formou monogenní obezity. Varianty v genu pro **MC4R** jsou dle literárních dat asociovány s množstvím tuku, tělesnou hmotností a rovněž s rizikem obezity a inzulinové rezistence u různých populací. Nedávná meta-analýza 15 GWAS potvrdila asociaci polymorfismu rs17782313, ležícího 188 kb před **MC4R** s BMI a rizikem obezity u dospělých i dětí. Překvapivě jsme nenalezli asociaci polymorfismu rs12970134 ani rs17782313 s obezitou ani s žádným z antropometrických parametrů, nicméně nositelky minoritní alely A (rs12970134) měly vyšší inzulinovou senzitivitu, vyšší hladiny růstového hormonu a leptinu. Naše studie naznačuje, že se variabilita **MC4R** uplatňuje nejen v regulaci energetického metabolismu, ale i v komplexnějších hypothalamických regulacích (37).

Detailní antropometrická data jsme využili při studiu různého efektu variability obezitogenních genů vybraných zejména na základě výsledků GWAS (tab.1), na BMI a další antropometrické ukazatele: obvod pasu, WHR, tělesné složení. Studovaná skupina zahrnovala 597 premenopauzálních žen (věk 29,4 ± 7,05 let; BMI 24,4 ± 4,30 kg/m²). BMI byl signifikantně asociován s polymorfismy rs7561317 (**TMEM18**; p = 0,008), rs9939609 (**FTO**; p = 0,022), rs29941 (**KCTD15**; p = 0,049); WHR s rs29941 (**KCTD15**; p = 0,005) a rs7561317 (**TMEM18**; p = 0,045); obvod pasu s rs7561317 (**TMEM18**; p = 0,016) a rs7498665 (**SH2B1**; p = 0,035); obvod břicha s rs7561317 (**TMEM18**; p = 0,012); tuková hmota s rs7561317 (**TMEM18**; p = 0,01) a rs1800592 (**UCPI**; p = 0,032); svalová hmota s rs1800592 (**UCPI**; p = 0,020) a rs925946 (**BDNF**; p = 0,040). Hodnoty p jsou udány pro minoritní vs. majoritní homozygoty. Potvrdili jsme asociaci šesti z deseti studovaných variant (**TMEM18**, **FTO**, **KCTD15**, **SH2B1**, **UCPI**, **BDNF**) s několika různými parametry charakterizujícími obezitu. Nejkomplexnější vliv na antropometrické ukazatele byl zjištěn u varianty rs7561317 genu **TMEM18**. Ta asociovala se základními antropometrickými parametry (BMI, WHR, obvodem pasu a břicha), ale i s tělesným složením (% tukové hmoty) (38).

„Obezitogeny“ a ovlivnění úspěšnosti redukčního režimu

Genetické varianty neovlivňují pouze náchylnost k obezitě, ale i úspěšnost různých hmotnostních redukčních režimů. Přehled známých genetických variant, které mají vliv na úspěšnost hubnutí a udržení snížené hmotnosti podává Hainer et al. (39). Několik z nich (**NMB** p73T (rs1051168); **UCP2** -866G/A (rs659366); **PPARG2** Pro12Ala (rs1801282) a **PPARA** Leu162Val (rs1800206)) jsme studovali u našich obezích pacientů před a po 2,5letém redukčním režimu (doporučená nízkokalorická dieta, zvýšená fyzická aktivita, změna životního stylu). Kromě antropometrických parametrů bylo měřeno tělesné složení; byly hodnoceny standardizované dotazníky týkající se jídelních zvyklostí (Three-Factor Eating Questionnaire – zahrnuje skóre restrikce, disinhbice a hladu) a skóre deprese (Beck Depression Inventory). Před vstupem do studie a po 2,5 letech sledování byly stanove-

Tab. 1 Studované genové varianty rizikové pro obezitu a frekvence minoritních alel (MAF) v české populaci (38)

| Gen | rs | Záměna | MAF v naší studii (%) | Frekvence MAF v Evropské populaci (HapMap-CEU European) (%) |
|---------------|------------|-------------------|-----------------------|-------------------------------------------------------------|
| <i>ADIPOQ</i> | rs2241766 | G/T | 10,1 | 13,3 |
| <i>BDNF</i> | rs4923461 | A/G | 21,4 | 23,0 |
| <i>BDNF</i> | rs925946 | G/T | 23,8 | 32,3 |
| <i>FTO</i> | rs9939609 | A/T | 43,9 | 46,0 |
| <i>KCTD15</i> | rs29941 | C/T | 30,5 | 32,3 |
| <i>MC4R</i> | rs12970134 | A/G | 25,5 | 27,9 |
| <i>MC4R</i> | rs17782313 | C/T | 28,0 | 28,0 |
| <i>PCSK1</i> | rs6232 | AAT/GAT Asn221Asp | 5,6 | 4,4 |
| <i>PCSK1</i> | rs6235 | C/G | 26,7 | 26,7 |
| <i>SEC16B</i> | rs10913469 | C/T | 18,0 | 25,4 |
| <i>SH2B1</i> | rs7498665 | ACA/GCA Thr484Ala | 42,5 | 38,1 |
| <i>TMEM18</i> | rs7561317 | A/G | 16,4 | 14,6 |
| <i>UCP1</i> | rs1800592 | A/G | 27,9 | 27,5 |

ny hladiny glukózy v séru, plazmatického adiponektinu, ghrelinu, leptinu a lipidový profil. Ač byly po 2,5 letech pozorovány signifikantní pozitivní změny v antropometrických ukazatelích, lipidovém profilu, hladinách leptinu, adiponektinu a ghrelinu, nebyl pozorován vliv na skóre dišihibice a deprese. Efekt variant *PPARG2* Pro12Ala a *PPARA* Leu162Val na antropometrické, biochemické, hormonální ani psychobehaviorální charakteristiky nebyl prokázán (40).

V případě neuromedinu β (*NMB*) byla potvrzena interakce s genotypem. *NMB* je členem rodiny peptidů podobných bombesinu. Tyto peptidy jsou exprimovány v mozku, pankreatu, nadledvinách a gastrointestinálním traktu. Regulují exokrinní i endokrinní sekrece, kontrakce hladkých svalů, příjem potravy, krevní tlak, glykémii, tělesnou teplotu a buněčný růst. Byla publikována signifikantní asociace polymorfismu P73T (rs1051168) se skórem dišihibice a s náchylností k hladu. Homozygotní mutace TT byla asociována se zvýšenou hmotností, BMI, obvodem pasu a tělesným tukem. V naší studii muži – nositelé alely T vykazovali na počátku léčby signifikantně vyšší příjem energie ($p = 0,009$), proteinů ($p = 0,018$) a tuku ($p = 0,002$) a vyšší skóre hladu ($p = 0,015$). Naopak muži, kteří nebyli nositelé alely T, lépe odpovídali na redukční program – vykazovali signifikantní snížení obvodu pasu, příjmu energie, skóre deprese. U žen před zahájením redukčního programu a ani po 2,5 letech redukčního programu nebyl zaznamenán žádný rozdíl mezi nositelkami a nenositelkami alely T kromě signifikantního snížení skóre hladu u žen, které nebyly nositelkami alely T (41).

V případě *UCP2*-866 G/A (rs659366) byl též u obézních žen pozorován vliv genotypu na rozvoj obezity a úspěšnost redukčního programu. Nositelky alely A na rozdíl od nenositelky udávaly signifikantně vyšší váhový přírůstek od 20 let svého věku (v průměru o 6 kg). Obě skupiny žen vykazovaly významné změny v energetickém a nutričním příjmu a v psy-

chobehaviorálních ukazatelích při kontrolním vyšetření po 2,5 letech sledování. Zajímavé je, že pouze nositelky alely A vykazovaly signifikantní pokles BMI $-0,7 \pm 0,28 \text{ kg/m}^2$ a hladin leptinu $-18,72 \pm 7,33 \mu\text{g/l}$ (zatím nepublikovaná data).

„Obezitogeny“ u dětí a mladistvých

Zapojili jsme se i do genetických studií cílených na dětskou obezitu a obezitu adolescentů.

V roce 2006 publikuje Hainerová et al. (42) studii provedenou u 289 dětí a mladistvých s časnou obezitou, u kterých bylo pátráno po variantách genu kódujícího neuromedinu U (*NMU*). *NMU* je anorexigenní peptid, který je exprimován v hypothalamu. Souvislost *NMU* s regulací příjmu potravy byla prokázána na myších modelech. Myši, kterým byl tento gen odstraněn, trpí hyperfagií a jsou velmi obézní. Naopak myši se zvýšenou expresí tohoto genu jsou štíhlé. V publikované studii nalezená vzácná varianta Arg165Trp v jedné z českých rodin kosegregovala s dětskou obezitou. U dánské dospělé populace bylo ověřeno, že s obezitou asociuje i polymorfismus Ala19Glu. Homozygotní nositelé alely Glu byli zastoupeni v souboru dospělých s obezitou a nadváhou více než dvojnásobně oproti souboru štíhlých jedinců.

Další studie hodnotí prevalenci mutací *MC4R* u českých obézních dětí, fenotyp nositelů těchto mutací a efekt mutací na hmotnostní redukční režim. Opět byl využit soubor dlouhodobě sledovaných 289 českých dětí a mladistvých s časnou obezitou. U všech pacientů byl osekvenován gen pro *MC4R*. Byla zjištěna prevalence mutací 2,4 % – bylo detekováno šest různých mutací u osmi probandů, včetně jedné nově popsané záměny Cys84Arg (u ní byla provedena funkční studie potvrzující snížení přenosu signálu *MC4R*) (43). Popsána byla i zajímavá kazuistika 20letého chlapce s hypogonadotropním hypogonadismem, který je nosite-

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

lem homozygotní mutace MC4R (G181D). U chlapce, který neodpovídal na intenzivní úpravu životosprávy a neustále přibýval na váze, byla nasazena léčba sibutraminem. Efekt léčby byl patrný, po roce chlapec zhubl, došlo ke zlepšení parametrů tělesného složení a některých metabolických abnormalit (44). Připomeňme i naši studii COPAT (Childhood Obesity Prevalence and Treatment), která v sobě snoubila epidemiologickou a intervenční část a jejíž mnohá data se ještě vyhodnocují. U 1443 adolescentů ve věku 13–17, 9 let byla provedena genotypizace 11 variant uvnitř (v blízkosti genů **TMEM18**, **SH2B1**, **KCTD15**, **PCSK1**, **BDNF**, **SECI6B**, **MC4R** a **FTO**) a byla studována jejich asociace s obezitou a metabolickým syndromem definovaným dle IDA (International Diabetes Federation). I v této věkové kategorii byla varianta **FTO** rs9939609 silně asociována s nadváhou a obezitou, zatímco podobně jako v dospělé české populaci je minoritní alela **TMEM18** rs7561317 naopak významně spojena s nízkou hmotností. Minoritní alely **BDNF** rs925946 a **MC4R** rs17782313 zvyšovaly riziko metabolického syndromu a naopak variantní alela **PCSK1** rs6235 snižovala hladinu krevní glukózy. Studie prokázala vliv těchto obezitogenních alel na obezitu, ale i na riziko metabolického syndromu (45).

V tomto přehledovém článku jsme se snažili podat nejen aktuální přehled současných znalostí genetického pozadí běžných forem obezity, které pomohly podhalit složitou regulaci energetické rovnováhy, ale dovoluji jsme si prezentovat i naše skromné příspěvky na tomto poli výzkumu.

Práce byly podpořeny zejména granty IGA MZ ČR, norským finančním mechanismem CZ0123 a podporou MZ ČR pro rozvoj výzkumné organizace (00023761, Endokrinologický ústav).

Seznam použitých zkratk

| | |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| BMI | body mass index |
| COPAT | childhood obesity prevalence and treatment |
| DNA | kyselina deoxyribonukleová |
| GIANT | the genetic investigation of anthropometric traits |
| GWAS | celogenomová asociční studie (genome-wide association study) |
| IDA | International Diabetes Federation |
| OGTT | orální glukózový toleranční test |
| PCOS | syndrom polycystických ovaríí (polycystic ovary syndrome) |
| RNA | kyselina ribonukleová |
| SNPs | jednonukleotidové polymorfismy (single nucleotide polymorphisms) |
| SSCP | polymorfismus konformace jednovláknové DNA (single-strand conformation polymorphism) |
| VMK | volné mastné kyseliny |
| WHO | Světová zdravotnická organizace (World Health Organization) |
| WHR | poměr pas/boky (waist to hip ratio) |

Literatura

1. **World Health Organization**: Obesity and overweight, Fact sheet #311, May 2012.
2. **Kelly T, et al**. Global burden of obesity in 2005 and projection to 2030. *Int J Obes (Lond)* 2008; 32: 1431–1437.

3. **Serdula MK, et al**. Do obese children become obese adults? A review of literature. *Prev Med* 1993; 22: 167–177.
4. **Freedman DS, et al**. Relation of body mass index and skinfold thicknesses to cardiovascular disease risk factors in children: the Bogalusa heart study. *Am J Clin Nutr* 2009; 90: 210–216.
5. **Jansen I, et al**. Prevalence and secular changes in abdominal obesity in Canadian adolescents and adults, 1981 to 2007–2009. *Obes Rev* 2011; 12: 397–405.
6. **Jansen I, et al**. Waist circumference and not body mass index explains obesity-related health risk. *Ann J Clin Nutr* 2004; 79: 379–384.
7. **Bigaard J, et al**. Waist circumference and body composition in relation to all-cause mortality in middle-aged men and women. *Int J Obes (Lond)* 2005; 29: 778–784.
8. **Erllichman J, et al**. Physical activity and its impact on health outcomes. Paper 2: prevention of unhealthy weight gain and obesity by physical activity: and analysis of the evidence. *Obes Rev* 2002; 3: 273–287.
9. **Stunkard AJ, et al**. The body mass index of twins who have been reared apart. *N Engl J Med* 1990; 322: 1483–1487.
10. **Allison DB et al**. The heritability of body mass index among the inter-racial sample of monozygotic twins reared apart. *Int J Obes Relat Met Disord* 1996; 20: 501–506.
11. **Maes HH, et al**. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav Genet* 1997; 27: 325–351.
12. **Rankinen T, et al**. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)* 2006; 14: 529–644.
13. **Sandholt CH, et al**. Beyond the fourth wave of genome-wide obesity association studies. *Nutr Diab* 2012; 2: e37; doi:10.1038/ntd.2012.9.
14. **Shmueli O, et al**. GeneNote: whole genome expression profiles in normal human tissues. *Comptes Rendus Biologies* 2003; 326: 1067–1072.
15. **van Vliet-Ostapchouk JV, et al**. Gene-lifestyle interactions in obesity. *Curr Nutr Rep* 2012; 1: 184–196.
16. **Andreassen CH, et al**. Low physical activity accentuates the effect of the **FTO** rs9939609 polymorphism on body fat accumulation. *Diabetes* 2008; 87: 95–101.
17. **Hainer V, Kunesová M, Parížková J, et al**. Serum cortisol and sex hormone binding globulin (SHBG) levels, body fat distribution and the role of genetic factors in obese females. *Sb Lek* 2002; 103(4): 471–475.
18. **Stich V, Harant I, De Gisezinski I, et al**. Adipose tissue lipolysis and hormone-sensitive lipase expression during very-low-calorie diet in obese female identical twins. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(3): 739–744.
19. **Kunesová M, Hainer V, Tvřizicka E, et al**. Assessment of dietary and genetic factors influencing serum and adipose fatty acid composition in obese female identical twins. *Lipids* 2002; 37(1): 27–32.
20. **Fried M, Kasalický M, Kunesová M, Hainer V**. Influence of some hereditary factors on weight loss following conservative and surgical treatment of obese female monozygotic twins. *Obes Surg* 1999; 9(3): 265–268.
21. **Hainer V, Stunkard AJ, Kunesová M, et al**. Intrapair resemblance in very low calorie diet-induced weight loss in female obese identical twins. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24(8): 1051–1057.
22. **Hainer V, Stunkard A, Kunesová M, et al**. A twin study of weight loss and metabolic efficiency. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25(4): 533–537.
23. **Hainer V, Kunešová M, Stunkard AJ, et al**. The within-pair resemblance in serum levels of androgens, sex-hormone binding globulin and cortisol in female obese identical twins – effect of negative energy balance induced by very low-calorie diet. *Horm Metab Res* 2001; 33(7): 417–422.
24. **Kunešová M, Phinney S, Hainer V, et al**. The responses of serum and adipose Fatty acids to a one-year weight reduction regimen in female obese monozygotic twins. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 967: 311–323.
25. **Bendlíová B, Mazura I, Včelák J, et al**. Is a mutation of the beta 3-adrenergic receptor gene related to non-insulin-dependent diabetes mellitus and juvenile hypertension in the Czech population? *Ann N Y Acad Sci* 1997; 20: 827: 135–143.

26. **Bendlová B, Mazura I, Včelák J, et al.** Mutation in the beta3-adrenergic receptor gene (Trp64Arg) does not influence insulin resistance, energy metabolism, fat distribution and lipid spectrum in young people. Pilot study. *Vnitř. Lék.* 1999; 45(5): 267–272.
27. **Šrámková D, Kunešová M, Hainer V, et al.** Is a Pro12Ala polymorphism of the PPARgamma2 gene related to obesity and type 2 diabetes mellitus in the Czech population? *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 967: 265–273.
28. **Bendlová B, et al.** PPARgamma2 Pro12Ala polymorphism in relation to free fatty acids concentration and composition in lean healthy Czech individuals with and without family history of diabetes type 2. *Physiol Res* 2008; 57(Suppl 1): S77–90.
29. **Šrámková D, Krejčichová S, Včelák J, et al.** The UCP1 gene polymorphism A-3826G in relation to DM2 and body composition in Czech population. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2007; 115(5): 303–307.
30. **Včelák J, Lukášová P, Vaňková M, et al.** FTO gene is associated not only with obesity-related quantitative traits but also with higher OGTT stimulated glycaemia and leptin levels. *Diabetologia* 2008; 51(Suppl 1): A818: S326.
31. **Wojciechowski P, Lipowska A, Rys P, et al.** Impact of FTO genotypes on BMI and weight in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia.* 2012; 55(10): 2636–2645.
32. **Hubáček JA, Bohuslavová R, Kuthanová L, et al.** The FTO gene and obesity in a large Eastern European population sample: the HAPIEE study. *Obesity (Silver Spring)* 2008; 16(12): 2764–2766.
33. **Hubáček JA, Pítha J, Adámková 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(4): 387–390.
34. **Hubáček JA, Stanek V, Gebauerová M, et al.** A FTO variant and risk of acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta* 2010; 411(15–16): 1069–1072.
35. **Hubáček JA, Víklík O, Dlouhá D, et al.** 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): 1030–1035.
36. **Dlouhá D, Pítha J, Lanská V, Hubáček JA.** Association between FTO 1st intron tagging variant and telomere length in middle aged females. 3PMFs study. *Clin Chim Acta* 2012; 413(15–16): 1222–1225.
37. **Bradnová O., Vaňková M., Lukášová P., et al.** Melanocortin-4 receptor gene polymorphism (rs12970134) influences glucose metabolism, leptin and GH levels in women. 12th European Congress of Endocrinology, 24.–28. 4. 2010. Prague, Czech Rep., Endocrine Abstracts 22: P352.
38. **Lukášová P, Vaňková M, Včelák J, et al.** Associations of Polymorphisms in Several Common Obesity-Susceptibility Genes with Body-Mass Index and Other Anthropometric Characteristics. *Diabetes ROK??;* 60(Suppl 1): A507: 1881.
39. **Hainer V, Zamrazilová H, Spálová J, et al.** Role of hereditary factors in weight loss and its maintenance. *Physiol Res* 2008; 57(Suppl 1): S1–15.
40. **Aldhoon B, Zamrazilová H, Aldhoon Hainerová I, et al.** Role of the PPARalpha Leu162Val and PPARgamma2 Pro12Ala gene polymorphisms in weight change after 2.5-year follow-up in Czech obese women. *Folia Biol (Praha)* 2010; 56(3): 116–123.
41. **Spálová J, Zamrazilová H, Včelák J, et al.** Neuromedin beta: P73T polymorphism in overweight and obese subjects. *Physiol Res.* 2008; 57(Suppl 1): S39–48.
42. **Hainerová I, Torekov SS, Ek J, et al.** Association between neuromedin U gene variants and overweight and obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(12): 5057–5063.
43. **Hainerová I, Larsen LH, Holst B, et al.** Melanocortin 4 receptor mutations in obese Czech children: studies of prevalence, phenotype development, weight reduction response, and functional analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(9): 3689–3696.
44. **Hainerová I, Zamrazilová H, Sedláčková D, Hainer V.** Hypogonadotropic hypogonadism in a homozygous MC4R mutation carrier and the effect of sibutramine treatment on body weight and obesity-related health risks. *Obes Facts* 2011; 4(4): 324–328.
45. **Dušítková L, Zamrazilová H, Sedláčková B, et al.** Association of obesity susceptibility gene variants with metabolic syndrome and related traits in 1,443 Czech adolescents. *Folia Biol (Praha)* 2013; 59(3): 123–133.

ADRESA PRO KORESPONDENCI:

doc. RNDr. Běla Bendlová, CSc.Endokrinologický ústav
Národní 8, 116 94 Praha 1
e-mail: bbendlova@endo.cz

5 Diskuze

5.1 Polymorfismy kandidátních genů pro obezitu ve vztahu k tělesné hmotnosti a tělesnému složení u českých adolescentů

V rámci dizertační práce byly hodnoceny polymorfismy kandidátních genů pro obezitu, vybrané na základě výsledků GWAS. U české populace byla již dříve potvrzena asociace variant genu *FTO* u dospělých (Hubacek et al. 2008) a později *FTO* a *MC4R* u dětí (Zlatohlavek et al. 2013). Ostatní polymorfismy nebyly u české adolescentní populace dosud zkoumány. Rovněž naše studie 1 443 adolescentů (**kapitola 4.1**) potvrdila souvislost rs9939609 genu *FTO* s nadměrnou tělesnou hmotností. Zjištěné odds ratio 1,40 pro nadváhu a obezitu odpovídalo efektu zjištěnému v předchozích studiích na dětské evropské populaci (Dina et al. 2007, Frayling et al. 2007). Neúspěšný záchyt asociace ostatních polymorfismů k BMI byl patrně dán nedostatečnou velikostí souboru s ohledem na pravděpodobně slabý efekt analyzovaných genových variant na tento parametr (den Hoed et al. 2010). Na rozšířeném souboru 1 953 adolescentů se nám již podařilo potvrdit asociaci rizikových alel rs7561317 *TMEM18*, rs10913469 *SEC16B* a *FTO* s vyšším BMI (**kapitola 4.3**). To koresponduje i s popsáním efektem variant genů *TMEM18* a *SEC16B* na BMI, který je právě u dětí silnější než u dospělých (den Hoed et al. 2010).

Složení vyšetřovaného souboru umožnilo provedení asociačních analýz i u jedinců s podváhou (BMI \leq 10. percentil) a identifikaci paradoxního vztahu podváhy s minoritní „nerizikovou“ alelou genu *TMEM18* (**kapitola 4.1**). Ačkoliv zastoupení minoritních homozygotů ve studii bylo nízké, výsledek připomněl důležitost věnovat se i opačnému fenotypu. Rovněž Jacquemont et al. ve své práci naznačují, že genetické pozadí extrémní obezity a podváhy může být sdíleno (Jacquemont et al. 2011).

Kromě BMI byla sledována řada dalších antropometrických parametrů a tělesné složení. Prokázána byla souvislost mezi obvodem pasu (ukazatelem viscerálního tuku) a celkovým tělesným tukem s polymorfismy genů *TMEM18*, *SEC16B* a *FTO*. Nicméně po adjustaci na BMI tyto závislosti vymizely. Tento fakt podporuje hypotézu, že se tyto běžné genové varianty podílejí na obecném rozvoji obezity, ale ne na distribuci tělesného tuku (Haupt et al. 2010).

5.2 Přítomnost protilátek proti adenoviru 36 a jejich vztah k tělesné hmotnosti a obezitě u českých adolescentů

Nedávná meta-analýza zahrnující jedenáct studií potvrdila, že Adv36 významně zvyšuje riziko obezity u dětí i dospělých (Shang et al. 2014). Na tento vztah poukázala i studie provedená na dosud největším publikovaném dětském souboru čítajícím téměř 1 200 jedinců, která je součástí dizertační práce (**kapitola 4.4**). Studie identifikovala 26,5% prevalenci Adv36 pozitivitu v rámci celého souboru (40% u jedinců s nadváhou, 28% u obézních). Vyšší prevalence u jedinců s nadváhou oproti obézním byla publikována rovněž u korejské populace (Na et al. 2012). Ostatní práce popisovaly vyšší výskyt Adv36 pozitivních jedinců mezi obézními (Yamada et al. 2012). Vysvětlením většího zastoupení Adv36 pozitivních jedinců mezi adolescenty s nadváhou může být jejich snaha více kontrolovat svou tělesnou hmotnost ve srovnání s jedinci již obézními. Tuto domněnku by potvrdil i fakt, že nejvyšší prevalence pozitivitu byla nalezena u dívek s nadváhou (55 %). Tyto dívky mohou být více ovlivněny dnešními společenskými trendy štíhlosti. Dalším faktorem, který je nutno při interpretaci výsledků zohlednit, je neznámá délka přítomnosti protilátek proti Adv36 v organismu – titr protilátek informuje o prodělání infekce bez specifikace času či aktuální přítomnosti virového agens. Adolescenti s nadváhou (či normální hmotností) mohli být infikováni teprve nedávno, tudíž se u nich obezita ještě neprojevila. Naopak u obézních jedinců mohla hladina protilátek po dlouhé době od infekce klesnout pod detekovatelnou mez. Longitudinální pozorování s opakovaným vyšetřením titru protilátek by tak mohlo poskytnout chybějící informace např. o době přetrvání protilátek v krvi či vztahu změny ne/přítomnosti protilátek u konkrétního jedince k tělesné hmotnosti. Nedávno byla na toto téma publikována studie, kde byli stejní jedinci sledováni na Adv36 pozitivitu v dětství (průměrný věk 12 let) a pak v dospělosti (41 let). V této studii se ale kauzální role infekce Adv36 v rozvoji obezity v průběhu života jednoznačně nepotvrdila. Byl zde pouze zaznamenán vyšší podíl Adv36 pozitivních dospělých, kteří se stali obézními oproti jedincům, kteří si zachovali normální hmotnost i v dospělosti (Sabin et al. 2015).

Dále byla zaznamenána významně vyšší prevalence protilátek proti Adv36 u dívek (33 %) oproti chlapcům (20 %). Přestože se v již zmíněných studiích amerických a korejských dětí podobný rozdíl nenašel (Atkinson et al. 2010, Gabbert et al. 2010), můžeme uvažovat nad vlivem estrogenů v náchylnosti k infekci Adv36 (James et al. 1992).

Hodnocení tělesného složení odhalilo asociaci protilátek proti Adv36 s celkovým a trunkálním tělesným tukem měřeným bioelektrickou impedancí. Souvislost s obvodem pasu byla nalezena pouze u podskupiny dívek, což koresponduje se závěry některých dětských studií (Atkinson et al. 2010, Gabbert et al. 2010). Tento vztah byl potvrzen i v navazující intervenční studii obézních dívek (**kapitola 4.5**), kde Adv36 pozitivní dívky více zredukovaly obvod pasu i abdominální tuk oproti dívkám bez protilátek.

5.3 Asociace polymorfismů kandidátních genů a Adv36 k metabolickým komplikacím obezity

Obezita souvisí s řadou zdravotních rizik a metabolických komplikací, které zahrnují poruchy metabolismu lipidů, inzulinovou rezistenci, poruchy glukózové tolerance, T2DM a metabolický syndrom (Hainer 2011). Zdravotní komplikace spojené s nadměrnou hmotností nepostihují jen dospělou populaci, ale často se vyskytují už v dětském věku (Lambert et al. 2008). T2DM se u českých adolescentů vyskytuje vzácně – u 0,4 % vyšetřených dětí (**kapitola 4.2**), což je obdobné jako např. v dalších oblastech střední a severní Evropy (Malecka-Tendera et al. 2005, Wiegand et al. 2004). Bez ohledu na tělesnou hmotnost bylo riziko porušené lačné glykémie významně vyšší u chlapců (výskyt u 9,7 %) oproti dívkám (4,4 %). To odpovídá i dalším studiím (Williams 2005, Xu et al. 2012) a zároveň podporuje tvrzení, že muži mají větší sklony k abnormalitám glukózové homeostáze než ženy (DECODE Study Group 2003, Kuhl et al. 2005). Stejně tak měli obézní chlapci vyšší riziko vzniku inzulinové rezistence oproti obézním dívkám. Účinným nástrojem k zachycení metabolického syndromu u dětí a adolescentů je index HOMA-IR (Tresaco et al. 2005). Podobně jako v čínské studii, i z výsledků zjištěných v rámci dizertační práce (**kapitola 4.2**) vyplývá, že se při zvyšujících hodnotách HOMA-IR zvyšuje i přítomnost komponent metabolického syndromu (Yin et al. 2013). Samotný metabolický syndrom byl diagnostikován u 16,6 % adolescentů s nadváhou a obezitou (**kapitola 4.1**).

V dizertační práci jsem se zabývala také analýzou vlivu genových variant na metabolický syndrom, resp. k jeho pěti komponentám – abdominální obezitě, dyslipidémii (hladiny HDL cholesterolu a triacylglycerolů), zhoršenému glukózovému metabolismu a hypertenzi (**kapitola 4.1**). Zaznamenána byla asociace varianty rs9939609 genu *FTO* s abdominální obezitou, která ale po adjustaci na BMI vymizela, což potvrzuje naše dříve

diskutované závěry. Některé studie sice našly závislosti genu *FTO* k metabolickým parametrům (Liem et al. 2009) i k metabolickému syndromu jako takovému (Wang et al. 2012, Zhou et al. 2012), záleželo však na použité definici metabolického syndromu. V rámci studie českých adolescentů, kde byla použita definice Mezinárodní diabetické federace (Zimmet et al. 2007), bylo zjištěno vyšší riziko metabolického syndromu pro rizikové alely rs925946 genu *BDNF* a rs12970134 a rs17782313 genu *MC4R*. Navíc byly tyto varianty asociovány u chlapců s abdominální obezitou. Role genu *BDNF* v patogenezi metabolického syndromu není doposud objasněna. Experimenty ukázaly zvýšené hladiny glukózy, inzulinu a leptinu u heterozygotní knockoutové myši (Duan et al. 2003). U lidí však nepřinesl výzkum této problematiky, např. sledování asociace hladin plazmatického BDNF s metabolickým syndromem konzistentní závěry (Corripio et al. 2012, Levinger et al. 2008). Polymorfismus rs925946 genu *BDNF* byl v jedné studii popsán v souvislosti se zvýšenou hladinou krevní glukózy, nicméně tato závislost byla pravděpodobně ovlivněna výší BMI (Sandholt et al. 2011). Ani polymorfismy genu *MC4R* nebyly dosud jednoznačně spojeny s metabolickým syndromem. Rs17782313 genu *MC4R* byl například asociován s nižší hladinou HDL cholesterolu (Kring et al. 2010) a vyšším diastolickým krevním tlakem u chlapců (Vogel et al. 2011). V dánské populační studii ale tato varianta s metabolickými ukazateli nesouvisela (Zobel et al. 2009). U českých adolescentů byla riziková alela rs6235 genu *PCSK1* méně zastoupená u jedinců s vyššími hladinami glukózy (**kapitola 4.1**). Rovněž v dánské studii byla tato alela asociována s nižšími hladinami glykémie (Gjesing et al. 2011). Tyto závěry podporují roli genu *PCSK1* v glukózovém metabolismu a rizikové polymorfismy pro obezitu tak mohou mít protektivní roli v rozvoji T2DM.

U zvířat infikovaných virem Adv36 byly nalezeny nízké sérové hladiny celkového cholesterolu a triacylglycerolů a experimentální studie naznačují anti-hyperglykemický efekt Adv36 (Dhurandhar et al. 2000, Pasarica et al. 2006). Souvislost Adv36 s metabolismem lipidů a cukrů byla hledána také u lidí (Almgren et al. 2012, Na et al. 2010) (**kapitoly 4.4, 4.5**). Adv36 pozitivní adolescenti z obecné české populace (**kapitola 4.4**) vykazovali vyšší hladiny celkového a LDL cholesterolu oproti jedincům bez protilátek, u obézní podskupiny se tato asociace již neobjevila. Také v rámci dílčí intervenční studie (**kapitola 4.5**) byly u obézních dívek kromě úbytků tělesné hmotnosti sledovány i biochemické a hormonální parametry s ohledem na přítomnost protilátek proti Adv36. Vzhledem k redukcí abdominální

obezity u Adv36 pozitivních dívek, se dalo očekávat i významné zlepšení metabolických ukazatelů. Nicméně metabolické a hormonální parametry se mezi Adv36 pozitivními a negativními dívkami nelišily, a to ani začátku ani na konci intervenčního programu. Lipidový profil se nelišil ani ve švédské studii obézních dětí (Almgren et al. 2012). Naopak u korejských dětí s obezitou byly detekovány vyšší hodnoty celkového cholesterolu u Adv36 pozitivních jedinců (Na et al. 2010).

Obdobné nekonzistentní výsledky platí i pro hodnocení glykemického profilu. Hladiny lačné glukózy byly signifikantně nižší u českých adolescentů pozitivních na Adv36 protilátky oproti negativním jedincům (**kapitola 4.4**). V jiných studiích na dětech se asociace s hladinou glukózy nebo markery inzulinové rezistence nenašly (Almgren et al. 2012, Atkinson et al. 2010, Trovato et al. 2009). Nutno podotknout, že všechny metabolické parametry se u dětí pohybují v normálním rozpětí hodnot a může být tak obtížné detekovat nějaké rozdíly. Ani studie na dospělých však nepřinesly jednoznačné závěry. Jen některé ukázaly v souladu se zvířecími studii nižší hladiny cholesterolu nebo triacylglycerolů (Atkinson et al. 2005, Na et al. 2012) a lepší glykemický profil (Lin et al. 2013) u Adv36 pozitivních jedinců. Meta-analýza studií publikovaných do roku 2012 efekt adenovirové infekce na metabolický profil nepotvrdila (Yamada et al. 2012). Na rozdíl od experimentálního výzkumu tedy nebyl vliv infekce Adv36 na změny metabolických parametrů u lidí dosud prokázán.

5.4 Energetický příjem českých adolescentů ve vztahu k polymorfismům kandidátních genů a Adv36

Dizertační práce se věnovala problematice energetického příjmu a zastoupení jednotlivých nutrientů u českých adolescentů, a to s ohledem na přítomnost rizikových alel pro obezitu a protilátek proti adenovirové infekci (**kapitoly 4.3, 4.5**). Obézní adolescenti měli ve srovnání s neobézními nižší příjem celkové energie i základních živin, včetně vápníku. Tento paradoxně nižší příjem kalorií u obézních dospívajících popsaly rovněž další studie (Garaulet et al. 2000, Hassapidou et al. 2006, Skinner et al. 2012). Vysvětlením může být rozdílná pohybová aktivita a tudíž odlišné energetické nároky. Běžné bývá také podhodnocování denního příjmu energie u obézních jedinců (Johansson et al. 1998). Nicméně podíl přijaté energie z tuků a bílkovin byl u obézních adolescentů vyšší (**kapitola 4.3**).

Nejen tělesná hmotnost, ale i příjem potravy je geneticky determinován (Faith et al. 1999). U nově objevených kandidátních genů pro obezitu se na základě jejich vysoké exprese v hypotalamu, předpokládá vliv na energetickou rovnováhu (Willer et al. 2009). I z těchto důvodů byla v rámci další studie zkoumána hypotéza, že vybrané polymorfismy kandidátních genů ovlivňují tělesnou hmotnost působením na energetický příjem a výběr jednotlivých nutrientů (**kapitola 4.3**). Rizikové alely rs925946 *BDNF* a rs9939609 *FTO* byly asociovány s nižšími hladinami vápníku, nicméně pouze u *BDNF* tento vztah zůstal významný po Bonferroniho korekci i adjustaci na BMI. *BDNF* je klíčovým prvkem melanokortinové dráhy v hypotalamu (Xu et al. 2003). Bylo prokázáno, že nedostatek vápníku zvyšuje riziko obezity u dětí i dospělých (Chaput et al. 2010, Goldberg et al. 2009). Jakým způsobem vápník ovlivňuje tělesnou hmotnost, nebylo přesně objasněno. Zmiňován bývá vliv na postprandiální oxidaci tuků, fekální exkreci tuků či lipolýzu a lipogenezi (Soares & She-Ping-Delfos 2010). V rámci dizertační práce byla poprvé popsána souvislost příjmu vápníku s genem *BDNF*. Je tedy potřeba dalších studií, které by tyto výsledky potvrdily a detailněji zkoumaly. U českých adolescentů byla dále detekována negativní asociace s příjmem proteinů a pozitivní asociace s příjmem vlákniny s rizikovou alelou rs17782313 genu *MC4R*. Jelikož obě tyto složky potravy stimulují pocit sytosti (Lyon & Kacinik 2012, Paddon-Jones et al. 2008), je otázkou, zda se varianty genu *MC4R* nepodílejí na regulaci energetické bilance i prostřednictvím příjmu proteinů a vlákniny. Byly publikované dvě práce, ve kterých byla studovaná varianta asociována s vyšším příjmem proteinů u žen (Qi et al. 2008) a s energií z celozrnných obilnin (Hasselbalch et al. 2010). Nicméně uvedené asociace s polymorfismem genu *MC4R*, včetně našich výsledků, nezůstaly významné po korekci na mnohonásobné testování.

Asociace jídelního příjmu s infekcí Adv36 byla hodnocena u 184 obézních dívek (**kapitola 4.5**). Publikované výsledky jsou unikátní vzhledem k tomu, že u lidí nebyl tento vztah dosud zkoumán. Zvířecí studie nenalezly rozdíl v energetickém příjmu s ohledem na přítomnost či nepřítomnost infekce (Dhurandhar et al. 2000, Pasarica et al. 2006). Příjem celkové energie a jednotlivých nutrientů se nelišil ani mezi Adv36 pozitivními a negativními dívkami.

5.5 Role infekce Adv36 v úspěšnosti redukčního režimu

Vyšetřované obézní dívky v rámci intervenční studie prošly 4týdenním pobytovým redukčním programem a byly u nich sledovány úbytky jednotlivých parametrů v závislosti na infekci Adv36 (**kapitola 4.5**). U Adv36 pozitivních dívek byly detekovány větší úbytky abdominálního tuku a naopak menší úbytky tuku podkožního oproti dívkám bez protilátek proti Adv36. Rozdíl v celkové redukci BMI a tělesné hmotnosti však nalezen nebyl. Tato nevýznamná asociace Adv36 k hmotnostní redukci může být vysvětlena i délkou trvání intervenčního programu. V jiné práci byly obdobně popsány pouze slabé rozdíly v úbytcích tělesné hmotnosti (0,48 kg) u dětí po krátkodobém redukčním programu v závislosti na adenovirové infekci (Vander Wal et al. 2013). Naopak Adv36 pozitivní dospělí po ročním redukčním programu snížili tělesnou hmotnost významně více než ti bez protilátek proti Adv36 (Trovato et al. 2012).

5.6 Interakce genetických a infekčních rizikových faktorů a jejich význam v patogenezi obezity

U české adolescentní populace se podařilo potvrdit vliv infekce Adv36 i některých polymorfismů kandidátních genů k nadváze a obezitě. Potenciální vztah mezi oběma zkoumanými faktory byl v rámci dizertační práce rovněž zjišťován (**kapitola 4.6**). U dvou kandidátních genů byla ukázána spojitost s adenovirovou infekcí. Minoritní alely variant rs6232 a rs6235 genu *PCSK1* byly asociovány s vyšším rizikem infekce Adv36, resp. s přítomností protilátek proti Adv36. Také nosičství rizikové alely rs4923461 genu *BDNF* bylo častější u Adv36 pozitivních jedinců. Varianta rs925946 tohoto genu byla frekventovanější u Adv36 pozitivních dívek. Po rozdělení souboru podle tělesné hmotnosti, byla nalezena významně vyšší prevalence Adv36 positivity u obézních nosičů rizikové alely rs6235 genu *PCSK1*. Oba geny – *BDNF* a *PCSK1* – se podílejí na hypotalamické regulaci energetické rovnováhy. V centrální nervové soustavě byl rovněž pozorován adipogenní efekt viru Adv36 u laboratorních krys (Pasarica et al. 2006). Kromě toho bylo experimentálně zjištěno, že Adv36 inhibuje produkci leptinu (Vangipuram et al. 2006). Můžeme však pouze spekulovat, zda jsou nalezené asociace způsobené vyšší náchylností geneticky predisponovaných jedinců k infekci (Karlsson et al. 2010), či zda existuje kombinovaný efekt genových variant a Adv36 na rozvoj obezity.

Kromě genů *BDNF* a *PCSK1* je i *MC4R* zapojen do regulace energetické rovnováhy a mutace ve všech těchto genech jsou příčinou monogenních forem časně obezity (Hinney et al. 2014). Z výsledků dizertační práce vyplývá, že mohou hrát významnou úlohu i v patogenezi běžné obezity. Pouze varianty těchto genů byly totiž v předkládané dizertační práci asociovány se sledovanými parametry souvisejícími s obezitou, např. metabolickým syndromem (*MC4R*, *BDNF*), glukózovým metabolismem (*PCSK1*), příjmem vápníku (*BDNF*) či infekcí Adv36 (*BDNF*, *PCSK1*). Komplikovaný výzkum genetického pozadí běžné obezity byl podrobně diskutován i v české rešerši (**kapitola 4.8**). Je důležité zmínit, jak obtížné je definovat přesnou úlohu genových variant v organismu i vzhledem k jejich umístění převážně do intergenních oblastí. Například gen *BDNF* se vyznačuje mnoha specifickými sestřihovými variantami (Liu et al. 2005). Jeho polymorfismy – rs4923461 a rs925946 se nachází se na tzv. nekódujícím antisense transkriptu genu *BDNF* (Liu et al. 2005). Bylo zjištěno, že narušení přirozené inhibiční funkce tohoto transkriptu zvýší hladiny BDNF (Modarresi et al. 2012). Tyto varianty by se tak mohly například podílet na regulaci genové exprese *BDNF* v hypotalamu. Pouze 15 % z 97 nejnověji potvrzených polymorfismů je v kódujících oblastech genů (Locke et al. 2015). Toto překvapivé zjištění může upozornit na důležitost regulačních mechanismů genové exprese nejen v patogenezi obezity. Zkoumané varianty mohou být také ve vazebné nerovnováze se vzácnými variantami, které nelze prostřednictvím GWAS detekovat.

Přes řadu popisovaných závislostí variant genu *FTO* s nejrůznějšími metabolickými, behaviorálními, klinickými parametry (**kapitola 4.7**), nebo například se zvýšeným rizikem infekce bakterií *Mycobacteria tuberculosis* (Feng et al. 2014) nebyl polymorfismus genu *FTO* v našich asociačních studiích spjat s žádným dalším znakem kromě BMI. Za rozdílnými pozorováními a závěry u jednotlivých studií může být genetická heterogenita i velikost souboru, která je zásadní pro studium genetických asociací. Menší studie nemusí mít dostatečnou statistickou sílu k zachycení slabých efektů rizikových variant, detekovaných na rozsáhlých populačních souborech (Speliotes et al. 2010). Interakce s faktory vnějšího prostředí pak mohou být ještě obtížněji zachytitelné a víc závislé na individuálním genetickém pozadí sledovaných jedinců (Dempfle et al. 2008). I z těchto důvodů je důležité naše pozorování potvrdit na větších souborech a jiných populačních skupinách.

6 Závěr

Předkládaná dizertační práce se věnovala dvěma významným rizikovým faktorům pro obezitu – polymorfismům kandidátních genů, které byly identifikovány na základě GWAS a infekci Adv36. Výzkum byl realizován na rozsáhlém, detailně charakterizovaném souboru českých adolescentů, jak z běžné populace, tak obézních jedinců, kteří podstoupili redukční program. To nám umožnilo hodnotit tyto faktory nejen ve vztahu k obezitě, ale i k dalším souvisejícím parametrům.

Ze sledovaných polymorfismů kandidátních genů byla potvrzena asociace s obezitou u tří variant genů *FTO*, *TMEM18* a *SEC16B*. Novým výsledkem byla asociace rizikových alel genů *MC4R* a *BDNF* s metabolickým syndromem. Riziková alela rs6235 genu *PCSK1* může být protektivní k T2DM. T2DM se u obézních dospívajících sice vyskytuje vzácně, nicméně porušená lačná glykémie u nich již častá je, jak ukázala naše další studie. Vzhledem k expresi většiny kandidátních genů v hypotalamu – centru regulace energetické rovnováhy, jsme dále hodnotili energetický příjem a zjistili souvislost tří genových variant s příjmem jednotlivých nutrientů. Studie především poukázala na možné ovlivnění příjmu vápníku běžnou variantou genu *BDNF*, a to nezávisle na BMI. Poprvé byl také sledován a potvrzen vztah infekce Adv36 k obezitě u české populace. Zvýšená prevalence protilátek byla nalezena zejména u adolescentů s nadváhou. Adv36 pozitivita dále souvisela s nižší glykémií i s redukcí ukazatelů abdominální obezity. Dosud nezkoumaný vztah polymorfismů k infekci Adv36 naznačil spojitost genů *BDNF* a *PCSK1* s přítomností protilátek. Součástí dizertační práce byla i rešerše popisující význam genu *FTO*, jež dosud patří mezi nejzásadnější objevy GWAS a rešerše shrnující dosavadní poznatky o výzkumu genetického pozadí obezity včetně příspěvků českých studií.

Stejně jako u většiny výsledků asociačních studií by bylo vhodné ověřit závěry dizertační práce na jiných a větších populačních souborech. Přesto věřím, že i zde prezentované dílčí výsledky přispívají k poznání jednotlivých kandidátních genů a infekčních faktorů a podporují jejich význam v patogenezi obezity.

7 Seznam použité literatury

- Ahluwalia N, Dalmasso P, Rasmussen M, Lipsky L, Currie C, et al. 2015. Trends in overweight prevalence among 11-, 13- and 15-year-olds in 25 countries in Europe, Canada and USA from 2002 to 2010. *Eur. J. Public Health.* 25 Suppl 2:28–32
- Al-Allaf FA, Coutelle C, Waddington SN, David AL, Harbottle R, Themis M. 2010. LDLR-Gene therapy for familial hypercholesterolaemia: problems, progress, and perspectives. *Int. Arch. Med.* 3:36
- Aldhoon-Hainerová I, Včelák J, Zamrazilová H. 2014. [Monogenic obesity - current status of molecular genetic research and clinical importance]. *Casopis lékařů českých.* 153(4):200–206
- Allison DB, Kaprio J, Korkeila M, Koskenvuo M, Neale MC, Hayakawa K. 1996. The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 20(6):501–6
- Almén MS, Jacobsson J a, Shaik JH a, Olszewski PK, Cedernaes J, et al. 2010. The obesity gene, TMEM18, is of ancient origin, found in majority of neuronal cells in all major brain regions and associated with obesity in severely obese children. *BMC Med. Genet.* 11:58
- Almgren M, Atkinson R, He J, Hilding A, Hagman E, et al. 2012. Adenovirus-36 is associated with obesity in children and adults in Sweden as determined by rapid ELISA. *PLoS One.* 7(7):e41652
- Almond MH, Edwards MR, Barclay WS, Johnston SL. 2013. Obesity and susceptibility to severe outcomes following respiratory viral infection. *Thorax.* 68(7):684–86
- Arslan E, Atilgan H, Yavaşoğlu I. 2009. The prevalence of Helicobacter pylori in obese subjects. *Eur. J. Intern. Med.* 20(7):695–97
- Atkinson RL, Dhurandhar N V, Allison DB, Bowen RL, Israel BA, et al. 2005. Human adenovirus-36 is associated with increased body weight and paradoxical reduction of serum lipids. *Int. J. Obes. (Lond).* 29(3):281–86
- Atkinson RL, Lee I, Shin H-J, He J. 2010. Human adenovirus-36 antibody status is associated with obesity in children. *Int. J. Pediatr. Obes.* 5(2):157–60
- Barrett JC, Cardon LR. 2006. Evaluating coverage of genome-wide association studies. *Nat. Genet.* 38(6):659–62
- Bauer F, Elbers CC, Adan RA, Loos RJ, Onland-Moret NC, et al. 2009. Obesity genes identified in genome-wide association studies are associated with adiposity measures and potentially with nutrient-specific food preference. *Am. J. Clin. Nutr.* 90(4):951–59
- Benzinou M, Creemers JWM, Choquet H, Lobbens S, Dina C, et al. 2008. Common nonsynonymous variants in PCSK1 confer risk of obesity. *Nat. Genet.* 40(8):943–45
- Berentzen T, Kring SII, Holst C, Zimmermann E, Jess T, et al. 2008. Lack of association of fatness-related FTO gene variants with energy expenditure or physical activity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93(7):2904–8

- Bhattacharyya D, Glick BS. 2007. Two mammalian Sec16 homologues have nonredundant functions in endoplasmic reticulum (ER) export and transitional ER organization. *Mol. Biol. Cell.* 18(3):839–49
- Boissel S, Reish O, Proulx K, Kawagoe-Takaki H, Sedgwick B, et al. 2009. Loss-of-function mutation in the dioxygenase-encoding FTO gene causes severe growth retardation and multiple malformations. *Am. J. Hum. Genet.* 85(1):106–11
- Bokor S, Frelut M-L, Vania A, Hadjiathanasiou CG, Anastasakou M, et al. 2008. Prevalence of metabolic syndrome in European obese children. *Int. J. Pediatr. Obes.* 3 Suppl 2:3–8
- Borrell LN, Samuel L. 2014. Body mass index categories and mortality risk in US adults: the effect of overweight and obesity on advancing death. *Am. J. Public Health.* 104(3):512–19
- Braithwaite I, Stewart AW, Hancox RJ, Beasley R, Murphy R, Mitchell EA. 2013. The worldwide association between television viewing and obesity in children and adolescents: cross sectional study. *PLoS One.* 8(9):e74263
- Cecil JE, Tavendale R, Watt P, Hetherington MM, Palmer CNA. 2008. An obesity-associated FTO gene variant and increased energy intake in children. *N. Engl. J. Med.* 359(24):2558–66
- Chambers JC, Elliott P, Zabaneh D, Zhang W, Li Y, et al. 2008. Common genetic variation near MC4R is associated with waist circumference and insulin resistance. *Nat. Genet.* 40(6):716–18
- Chapman SJ, Hill AVS. 2012. Human genetic susceptibility to infectious disease. *Nat. Rev. Genet.* 13(3):175–88
- Chaput J-P, Sjödin AM, Astrup A, Després J-P, Bouchard C, Tremblay A. 2010. Risk factors for adult overweight and obesity: the importance of looking beyond the “big two”. *Obes. Facts.* 3(5):320–27
- Chaudhri O, Small C, Bloom S. 2006. Gastrointestinal hormones regulating appetite. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 361(1471):1187–1209
- Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Weingarth DT, Adams JR, et al. 2004. Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology.* 145(6):2607–12
- Choh AC, Lee M, Kent JW, Diego VP, Johnson W, et al. 2014. Gene-by-age effects on BMI from birth to adulthood: the Fels Longitudinal Study. *Obesity (Silver Spring).* 22(3):875–81
- Church C, Moir L, McMurray F, Girard C, Banks GT, et al. 2010. Overexpression of Fto leads to increased food intake and results in obesity. *Nat. Genet.* 42(12):1086–92
- Clément K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, et al. 1998. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature.* 392(6674):398–401
- Corripio R, González-Clemente J-M, Jacobo P-S, Silvia N, Lluís G, et al. 2012. Plasma brain-derived neurotrophic factor in prepubertal obese children: results from a 2-year lifestyle intervention programme. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 77(5):715–20
- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdán MG, Diano S, et al. 2001. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature.* 411(6836):480–84

- DECODE Study Group. 2003. Age- and sex-specific prevalences of diabetes and impaired glucose regulation in 13 European cohorts. *Diabetes Care*. 26(1):61–69
- Dempfle A, Scherag A, Hein R, Beckmann L, Chang-Claude J, Schäfer H. 2008. Gene-environment interactions for complex traits: definitions, methodological requirements and challenges. *Eur. J. Hum. Genet.* 16(10):1164–72
- Den Hoed M, Ekelund U, Brage S, Grontved A, Zhao JH, et al. 2010. Genetic susceptibility to obesity and related traits in childhood and adolescence: influence of loci identified by genome-wide association studies. *Diabetes*. 59(11):2980–88
- Dhurandhar EJ, Dubuisson O, Mashtalir N, Krishnapuram R, Hegde V, Dhurandhar N V. 2011. E4orf1: a novel ligand that improves glucose disposal in cell culture. *PLoS One*. 6(8):e23394
- Dhurandhar N V, Israel BA, Kolesar JM, Mayhew GF, Cook ME, Atkinson RL. 2000. Increased adiposity in animals due to a human virus. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 24(8):989–96
- Dhurandhar N V, Whigham LD, Abbott DH, Schultz-Darken NJ, Israel BA, et al. 2002. Human adenovirus Ad-36 promotes weight gain in male rhesus and marmoset monkeys. *J. Nutr.* 132(10):3155–60
- Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Körner A, et al. 2007. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat. Genet.* 39(6):724–26
- Duan W, Guo Z, Jiang H, Ware M, Mattson MP. 2003. Reversal of behavioral and metabolic abnormalities, and insulin resistance syndrome, by dietary restriction in mice deficient in brain-derived neurotrophic factor. *Endocrinology*. 144(6):2446–53
- Elks CE, Loos RJF, Hardy R, Wills AK, Wong A, et al. 2012. Adult obesity susceptibility variants are associated with greater childhood weight gain and a faster tempo of growth: the 1946 British Birth Cohort Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 95(5):1150–56
- Faith MS, Rha SS, Neale MC, Allison DB. 1999. Evidence for genetic influences on human energy intake: results from a twin study using measured observations. *Behav. Genet.* 29(3):145–54
- Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GSH, Lank EJ, Cheetham T, O’Rahilly S. 2003. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N. Engl. J. Med.* 348(12):1085–95
- Feng Y, Wang F, Pan H, Qiu S, Lü J, et al. 2014. Obesity-associated gene FTO rs9939609 polymorphism in relation to the risk of tuberculosis. *BMC Infect. Dis.* 14:592
- Fischer J, Koch L, Emmerling C, Vierkotten J, Peters T, et al. 2009. Inactivation of the Fto gene protects from obesity. *Nature*. 458(7240):894–98
- Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, et al. 2007. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*. 316(5826):889–94
- Freathy RM, Timpson NJ, Lawlor DA, Pouta A, Ben-Shlomo Y, et al. 2008. Common variation in the FTO gene alters diabetes-related metabolic traits to the extent expected given its effect on BMI. *Diabetes*. 57(5):1419–26
- Gabbert C, Donohue M, Arnold J, Schwimmer JB. 2010. Adenovirus 36 and obesity in children and adolescents. *Pediatrics*. 126(4):721–26

- Garaulet M, Martínez A, Victoria F, Pérez-Llamas F, Ortega RM, Zamora S. 2000. Difference in dietary intake and activity level between normal-weight and overweight or obese adolescents. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 30(3):253–58
- Garcia MN, Philpott DC, Murray KO, Ontiveros A, Revell PA, et al. 2015. Clinical predictors of disease severity during the 2009-2010 A(H1N1) influenza virus pandemic in a paediatric population. *Epidemiol. Infect.* 1–11
- Geller F, Reichwald K, Dempfle A, Illig T, Vollmert C, et al. 2004. Melanocortin-4 receptor gene variant I103 is negatively associated with obesity. *Am. J. Hum. Genet.* 74(3):572–81
- Gerken T, Girard CA, Tung Y-CL, Webby CJ, Saudek V, et al. 2007. The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science.* 318(5855):1469–72
- Gjesing AP, Vestmar MA, Jørgensen T, Henri M, Holst JJ, et al. 2011. The effect of PCSK1 variants on waist, waist-hip ratio and glucose metabolism is modified by sex and glucose tolerance status. *PLoS One.* 6(9):e23907
- Goldberg TBL, da Silva CC, Peres LNL, Berbel MN, Heigasi MB, et al. 2009. Calcium intake and its relationship with risk of overweight and obesity in adolescents. *Arch. Latinoam. Nutr.* 59(1):14–21
- Goossens VJ, deJager SA, Grauls GE, Gielen M, Vlietinck RF, et al. 2009. Lack of Evidence for the Role of Human Adenovirus-36 in Obesity in a European Cohort. *Obesity.* 19(1):220–21
- Gray J, Yeo GSH, Cox JJ, Morton J, Adlam A-LR, et al. 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.* 55(12):3366–71
- Gulati P, Cheung MK, Antrobus R, Church CD, Harding HP, et al. 2013. Role for the obesity-related FTO gene in the cellular sensing of amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110(7):2557–62
- Guo SS, Wu W, Chumlea WC, Roche AF. 2002. Predicting overweight and obesity in adulthood from body mass index values in childhood and adolescence. *Am. J. Clin. Nutr.* 76(3):653–58
- Hainer V. 2011. *ZÁKLADY KLINICKÉ OBEZITOLOGIE*. Praha: Grada Publishing, a.s. 2. ed.
- Hainer V, Stunkard AJ, Kunesová M, Parízková J, Stich V, Allison DB. 2000. Intrapair resemblance in very low calorie diet-induced weight loss in female obese identical twins. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 24(8):1051–57
- Hainerová I, Larsen LH, Holst B, Finková M, Hainer V, et al. 2007. Melanocortin 4 receptor mutations in obese Czech children: studies of prevalence, phenotype development, weight reduction response, and functional analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92(9):3689–96
- Han Z, Niu T, Chang J, Lei X, Zhao M, et al. 2010. Crystal structure of the FTO protein reveals basis for its substrate specificity. *Nature.* 464(7292):1205–9
- Hardy R, Wills AK, Wong A, Elks CE, Wareham NJ, et al. 2010. Life course variations in the associations between FTO and MC4R gene variants and body size. *Hum. Mol. Genet.* 19(3):545–52

- Hassapidou M, Fotiadou E, Maglara E, Papadopoulou SK. 2006. Energy intake, diet composition, energy expenditure, and body fatness of adolescents in northern Greece. *Obesity (Silver Spring)*. 14(5):855–62
- Hasselbalch AL, Angquist L, Christiansen L, Heitmann BL, Kyvik KO, Sørensen TIA. 2010. A variant in the fat mass and obesity-associated gene (FTO) and variants near the melanocortin-4 receptor gene (MC4R) do not influence dietary intake. *J. Nutr.* 140(4):831–34
- Haupt A, Thamer C, Heni M, Machicao F, Machann J, et al. 2010. Novel obesity risk loci do not determine distribution of body fat depots: a whole-body MRI/MRS study. *Obesity (Silver Spring)*. 18(6):1212–17
- Heid IM, Jackson AU, Randall JC, Winkler TW, Qi L, et al. 2010. Meta-analysis identifies 13 new loci associated with waist-hip ratio and reveals sexual dimorphism in the genetic basis of fat distribution. *Nat. Genet.* 42(11):949–60
- Heni M, Haupt A, Schäfer SA, Ketterer C, Thamer C, et al. 2010. Association of obesity risk SNPs in PCSK1 with insulin sensitivity and proinsulin conversion. *BMC Med. Genet.* 11:86
- Hinney A, Volckmar A-L, Antel J. 2014. Genes and the hypothalamic control of metabolism in humans. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 28(5):635–47
- Hjorth MF, Chaput J-P, Ritz C, Dalskov S-M, Andersen R, et al. 2014. Fatness predicts decreased physical activity and increased sedentary time, but not vice versa: support from a longitudinal study in 8- to 11-year-old children. *Int. J. Obes. (Lond)*. 38(7):959–65
- Holt EH, Lane MD. 2001. Downregulation of repressive CUP/AP-2 isoforms during adipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288(4):752–56
- Hubacek JA, Bohuslavova R, Kuthanova L, Kubinova R, Peasey A, et al. 2008. The FTO gene and obesity in a large Eastern European population sample: the HAPIEE study. *Obesity (Silver Spring)*. 16(12):2764–66
- Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, et al. 1997. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*. 88(1):131–41
- International HapMap Consortium. 2005. A haplotype map of the human genome. *Nature*. 437(7063):1299–1320
- Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, Raffin-Sanson ML, Sanders L, et al. 1997. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat. Genet.* 16(3):303–6
- Jacquemont S, Reymond A, Zufferey F, Harewood L, Walters RG, et al. 2011. Mirror extreme BMI phenotypes associated with gene dosage at the chromosome 16p11.2 locus. *Nature*. 478(7367):97–102
- James CB, Vanderpool EA, Roane P. 1992. Acceleration of adenovirus replication and increased virion production by treatment with the steroid hormone 17 beta-estradiol. *Microbiol. Immunol.* 36(1):99–103
- Jamshidi Y, Snieder H, Ge D, Spector TD, O'Dell SD. 2007. The SH2B gene is associated with serum leptin and body fat in normal female twins. *Obesity (Silver Spring)*. 15(1):5–9

- Jansen E, Ayoubi TA, Meulemans SM, Van de Ven WJ. 1995. Neuroendocrine-specific expression of the human prohormone convertase 1 gene. Hormonal regulation of transcription through distinct cAMP response elements. *J. Biol. Chem.* 270(25):15391–97
- Johansson L, Solvoll K, Bjørneboe GE, Drevon CA. 1998. Under- and overreporting of energy intake related to weight status and lifestyle in a nationwide sample. *Am. J. Clin. Nutr.* 68(2):266–74
- Jurvansuu J, Zhao Y, Leung DSY, Boulaire J, Yu YH, et al. 2008. Transmembrane protein 18 enhances the tropism of neural stem cells for glioma cells. *Cancer Res.* 68(12):4614–22
- Jurvansuu JM, Goldman A. 2011. Obesity Risk Gene TMEM18 Encodes a Sequence-Specific DNA-Binding Protein. *PLoS One.* 6(9):e25317
- Karamese M, Altoparlak U, Turgut A, Aydogdu S, Karamese SA. 2015. The relationship between adenovirus-36 seropositivity, obesity and metabolic profile in Turkish children and adults. *Epidemiol. Infect.* 1–7
- Karlsson EA, Sheridan PA, Beck MA. 2010. Diet-induced obesity impairs the T cell memory response to influenza virus infection. *J. Immunol.* 184(6):3127–33
- Karra E, O’Daly OG, Choudhury AI, Yousseif A, Millership S, et al. 2013. A link between FTO, ghrelin, and impaired brain food-cue responsivity. *J. Clin. Invest.* 123(8):3539–51
- Katzmarzyk PT, Malina RM, Pérusse L, Rice T, Province MA, et al. 2000. Familial resemblance in fatness and fat distribution. *Am. J. Hum. Biol.* 12(3):395–404
- Kilpeläinen TO, Qi L, Brage S, Sharp SJ, Sonestedt E, et al. 2011a. Physical activity attenuates the influence of FTO variants on obesity risk: a meta-analysis of 218,166 adults and 19,268 children. *PLoS Med.* 8(11):e1001116
- Kilpeläinen TO, Zillikens MC, Stančáková A, Finucane FM, Ried JS, et al. 2011b. Genetic variation near IRS1 associates with reduced adiposity and an impaired metabolic profile. *Nat. Genet.* 43(8):753–60
- Kim JD, Leyva S, Diano S. 2014. Hormonal regulation of the hypothalamic melanocortin system. *Front. Physiol.* 5:480
- Kring SII, Holst C, Toubro S, Astrup A, Hansen T, et al. 2010. Common variants near MC4R in relation to body fat, body fat distribution, metabolic traits and energy expenditure. *Int. J. Obes. (Lond).* 34(1):182–89
- Kuhl J, Hilding A, Ostenson CG, Grill V, Efendic S, Båvenholm P. 2005. Characterisation of subjects with early abnormalities of glucose tolerance in the Stockholm Diabetes Prevention Programme: the impact of sex and type 2 diabetes heredity. *Diabetologia.* 48(1):35–40
- Kunesová M, Hainer V, Tvrzicka E, Phinney SD, Stich V, et al. 2002. Assessment of dietary and genetic factors influencing serum and adipose fatty acid composition in obese female identical twins. *Lipids.* 37(1):27–32
- Lajunen T, Bloigu A, Paldanius M, Pouta A, Laitinen J, et al. 2011. The association of body mass index, waist and hip circumference, and waist-hip ratio with Chlamydia pneumoniae IgG antibodies and high-sensitive C-reactive protein at 31 years of age in Northern Finland Birth Cohort 1966. *Int. J. Obes.* 35(12):1470–78

- Lambert M, Delvin EE, Levy E, O'Loughlin J, Paradis G, et al. 2008. Prevalence of cardiometabolic risk factors by weight status in a population-based sample of Quebec children and adolescents. *Can. J. Cardiol.* 24(7):575–83
- Levinger I, Goodman C, Matthews V, Hare DL, Jerums G, et al. 2008. BDNF, Metabolic Risk Factors, and Resistance Training in Middle-Aged Individuals. *Med. Sci. Sport. Exerc.* 40(3):535–41
- Li Z, Zhou Y, Carter-Su C, Myers MG, Rui L. 2007. SH2B1 enhances leptin signaling by both Janus kinase 2 Tyr813 phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *Mol. Endocrinol.* 21(9):2270–81
- Liem ET, Vonk JM, Sauer PJ, van der Steege G, Oosterom E, et al. 2009. Influence of common variants near INSIG2, in FTO, and near MC4R genes on overweight and the metabolic profile in adolescence: the TRAILS (TRacking Adolescents' Individual Lives Survey) Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 91(2):321–28
- Lin W-Y, Dubuisson O, Rubicz R, Liu N, Allison DB, et al. 2013. Long-term changes in adiposity and glycemic control are associated with past adenovirus infection. *Diabetes Care.* 36(3):701–7
- Lindgren CM, Heid IM, Randall JC, Lamina C, Steinthorsdottir V, et al. 2009. Genome-wide association scan meta-analysis identifies three Loci influencing adiposity and fat distribution. *PLoS Genet.* 5(6):e1000508
- Liu Q-R, Walther D, Drgon T, Poleskaya O, Lesnick TG, et al. 2005. Human brain derived neurotrophic factor (BDNF) genes, splicing patterns, and assessments of associations with substance abuse and Parkinson's Disease. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 134B(1):93–103
- Lloyd DJ, Bohan S, Gekakis N. 2006. Obesity, hyperphagia and increased metabolic efficiency in Pcl mutant mice. *Hum. Mol. Genet.* 15(11):1884–93
- Locke AE, Kahali B, Berndt SI, Justice AE, Pers TH, et al. 2015. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature.* 518(7538):197–206
- Loos RJF. 2009. Recent progress in the genetics of common obesity. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 68(6):811–29
- Loos RJF. 2012. Genetic determinants of common obesity and their value in prediction. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 26(2):211–26
- Loos RJF, Lindgren CM, Li S, Wheeler E, Zhao JH, et al. 2008. Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat. Genet.* 40(6):768–75
- Lyon MR, Kacinik V. 2012. Is There a Place for Dietary Fiber Supplements in Weight Management? *Curr. Obes. Rep.* 1(2):59–67
- Malecka-Tendera E, Erhardt E, Molnár D. 2005. Type 2 diabetes mellitus in European children and adolescents. *Acta Paediatr.* 94(5):543–46
- Marsh DJ, Hollopeter G, Huszar D, Laufer R, Yagaloff KA, et al. 1999. Response of melanocortin-4 receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides. *Nat. Genet.* 21(1):119–22

- McCaffery JM, Papandonatos GD, Peter I, Huggins GS, Raynor HA DL, Cheskin LJ, Balasubramanyam A, Wagenknecht LE WR. 2012. Obesity susceptibility loci and dietary intake in the Look AHEAD Trial. *Am J Clin Nutr.* 95(6):1477–86
- Modarresi F, Faghihi MA, Lopez-Toledano MA, Fatemi RP, Magistri M, et al. 2012. Inhibition of natural antisense transcripts in vivo results in gene-specific transcriptional upregulation. *Nat. Biotechnol.* 30(5):453–59
- Monda KL, Chen GK, Taylor KC, Palmer C, Edwards TL, et al. 2013. A meta-analysis identifies new loci associated with body mass index in individuals of African ancestry. *Nat. Genet.* 45(6):690–96
- Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, et al. 1997. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature.* 387(6636):903–8
- Müller TD, Hinney A, Scherag A, Nguyen TT, Schreiner F, et al. 2008. “Fat mass and obesity associated” gene (FTO): no significant association of variant rs9939609 with weight loss in a lifestyle intervention and lipid metabolism markers in German obese children and adolescents. *BMC Med. Genet.* 9:85
- Na H-N, Hong Y-M, Kim J, Kim H-K, Jo I, Nam J-H. 2010. Association between human adenovirus-36 and lipid disorders in Korean schoolchildren. *Int. J. Obes. (Lond).* 34(1):89–93
- Na H-N, Kim J, Lee HS, Shim KW, Kimm H, et al. 2012. Association of human adenovirus-36 in overweight Korean adults. *Int. J. Obes. (Lond).* 36(2):281–85
- Nead KT, Li A, Wehner MR, Neupane B, Gustafsson S, et al. 2015. Contribution of common non-synonymous variants in PCSK1 to body mass index variation and risk of obesity: a systematic review and meta-analysis with evidence from up to 331 175 individuals. *Hum. Mol. Genet.* 24(12):3582–94
- Niemeier HM, Raynor HA, Lloyd-Richardson EE, Rogers ML, Wing RR. 2006. Fast food consumption and breakfast skipping: predictors of weight gain from adolescence to adulthood in a nationally representative sample. *J. Adolesc. Health.* 39(6):842–49
- Ogden CL, Carroll MD, Kit BK, Flegal KM. 2014. Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011-2012. *JAMA.* 311(8):806–14
- Paddon-Jones D, Westman E, Mattes RD, Wolfe RR, Astrup A, Westerterp-Plantenga M. 2008. Protein, weight management, and satiety. *Am. J. Clin. Nutr.* 87(5):1558S – 1561S
- Pasarica M, Mashtalir N, McAllister EJ, Kilroy GE, Koska J, et al. 2008. Adipogenic human adenovirus Ad-36 induces commitment, differentiation, and lipid accumulation in human adipose-derived stem cells. *Stem Cells.* 26(4):969–78
- Pasarica M, Shin AC, Yu M, Ou Yang H-M, Rathod M, et al. 2006. Human adenovirus 36 induces adiposity, increases insulin sensitivity, and alters hypothalamic monoamines in rats. *Obesity (Silver Spring).* 14(11):1905–13
- Paternoster L, Evans DM, Nohr EA, Holst C, Gaborieau V, et al. 2011. Genome-wide population-based association study of extremely overweight young adults--the GOYA study. *PLoS One.* 6(9):e24303

- Ponterio E, Gnessi L. 2015. Adenovirus 36 and Obesity: An Overview. *Viruses*. 7(7):3719–40
- Puklová V. 2013. Výskyt nadváhy a obezity [internet]. Státní zdravotní ústav, Praha; září 2013 [citováno listopad 2015]. *Dostupné z* http://www.szu.cz/uploads/documents/chzp/info_listy/Vyskyt_nadvahy_a_obezity_2013.pdf
- Qi L, Kraft P, Hunter DJ, Hu FB. 2008. The common obesity variant near MC4R gene is associated with higher intakes of total energy and dietary fat, weight change and diabetes risk in women. *Hum. Mol. Genet.* 17(22):3502–8
- Qi Q, Downer MK, Kilpeläinen TO, Taal HR, Barton SJ, et al. 2015. Dietary intake, FTO genetic variants and adiposity: a combined analysis of over 16,000 children and adolescents. *Diabetes*
- Qi Q, Kilpeläinen TO, Downer MK, Tanaka T, Smith CE, et al. 2014. FTO genetic variants, dietary intake and body mass index: insights from 177,330 individuals. *Hum. Mol. Genet.* 23(25):6961–72
- Randall JC, Winkler TW, Kutalik Z, Berndt SI, Jackson AU, et al. 2013. Sex-stratified genome-wide association studies including 270,000 individuals show sexual dimorphism in genetic loci for anthropometric traits. *PLoS Genet.* 9(6):e1003500
- Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, et al. 2006. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)*. 14(4):529–644
- Rask-Andersen M, Almén MS, Olausen HR, Olszewski PK, Eriksson J, et al. 2011. Functional coupling analysis suggests link between the obesity gene FTO and the BDNF-NTRK2 signaling pathway. *BMC Neurosci.* 12(1):117
- Ren D, Zhou Y, Morris D, Li M, Li Z, Rui L. 2007. Neuronal SH2B1 is essential for controlling energy and glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* 117(2):397–406
- Renström F, Payne F, Nordström A, Brito EC, Rolandsson O, et al. 2009. Replication and extension of genome-wide association study results for obesity in 4923 adults from northern Sweden. *Hum. Mol. Genet.* 18(8):1489–96
- Riedel H, Wang J, Hansen H, Yousaf N. 1997. PSM, an insulin-dependent, pro-rich, PH, SH2 domain containing partner of the insulin receptor. *J. Biochem.* 122(6):1105–13
- Rukh G, Sonestedt E, Melander O, Hedblad B, Wirfält E, et al. 2013. Genetic susceptibility to obesity and diet intakes: association and interaction analyses in the Malmö Diet and Cancer Study. *Genes Nutr.* 8(6):535–47
- Rutherford J, McGuffin P, Katz RJ, Murray RM. 1993. Genetic influences on eating attitudes in a normal female twin population. *Psychol. Med.* 23(2):425–36
- Rzehak P, Scherag A, Grallert H, Sausenthaler S, Koletzko S, et al. 2010. Associations between BMI and the FTO gene are age dependent: results from the GINI and LISA birth cohort studies up to age 6 years. *Obes. Facts.* 3(3):173–80
- Sabin MA, Burgner D, Atkinson RL, Pei-Lun Lee Z, Magnussen CG, et al. 2015. Longitudinal investigation of adenovirus 36 seropositivity and human obesity: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Int. J. Obes. (Lond)*.

- Sandholt CH, Hansen T, Pedersen O. 2012. Beyond the fourth wave of genome-wide obesity association studies. *Nutr. Diabetes*. 2(7):e37
- Sandholt CH, Vestmar MA, Bille DS, Borglykke A, Almind K, et al. 2011. Studies of metabolic phenotypic correlates of 15 obesity associated gene variants. *PLoS One*. 6(9):e23531
- Satomura E, Baba H, Nakano Y, Maeshima H, Suzuki T, Arai H. 2011. Correlations between brain-derived neurotrophic factor and clinical symptoms in medicated patients with major depression. *J. Affect. Disord*. 135(1-3):332–35
- Saunders CL, Chiodini BD, Sham P, Lewis CM, Abkevich V, et al. 2007. Meta-analysis of genome-wide linkage studies in BMI and obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 15(9):2263–75
- Scherag A, Dina C, Hinney A, Vatin V, Scherag S, et al. 2010. Two new Loci for body-weight regulation identified in a joint analysis of genome-wide association studies for early-onset extreme obesity in French and German study groups. *PLoS Genet*. 6(4):e1000916
- Shang Q, Wang H, Song Y, Wei L, Lavebratt C, et al. 2014. Serological data analyses show that adenovirus 36 infection is associated with obesity: a meta-analysis involving 5739 subjects. *Obesity (Silver Spring)*. 22(3):895–900
- Skinner AC, Steiner MJ, Perrin EM. 2012. Self-reported energy intake by age in overweight and healthy-weight children in NHANES, 2001-2008. *Pediatrics*. 130(4):e936–42
- Smemo S, Tena JJ, Kim K-H, Gamazon ER, Sakabe NJ, et al. 2014. Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3. *Nature*. 507(7492):371–75
- Soares MJ, She-Ping-Delfos WLC. 2010. Postprandial energy metabolism in the regulation of body weight: is there a mechanistic role for dietary calcium? *Nutrients*. 2(6):586–98
- Speakman JR, Rance KA, Johnstone AM. 2008. Polymorphisms of the FTO gene are associated with variation in energy intake, but not energy expenditure. *Obesity (Silver Spring)*. 16(8):1961–65
- Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, Monda KL, Thorleifsson G, et al. 2010. Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat. Genet*. 42(11):937–48
- Stanley S, Wynne K, McGowan B, Bloom S. 2005. Hormonal regulation of food intake. *Physiol. Rev*. 85(4):1131–58
- Stratigopoulos G, Martin Carli JF, O'Day DR, Wang L, Leduc CA, et al. 2014. Hypomorphism for RPGRIP1L, a ciliary gene vicinal to the FTO locus, causes increased adiposity in mice. *Cell Metab*. 19(5):767–79
- Stunkard AJ, Foch TT, Hrubec Z. 1986. A twin study of human obesity. *JAMA*. 256(1):51–54
- Stutzmann F, Vatin V, Cauchi S, Morandi A, Jouret B, et al. 2007. Non-synonymous polymorphisms in melanocortin-4 receptor protect against obesity: the two facets of a Janus obesity gene. *Hum. Mol. Genet*. 16(15):1837–44
- Tanaka S, Inoue S, Isoda F, Waseda M, Ishihara M, et al. 1993. Impaired immunity in obesity: suppressed but reversible lymphocyte responsiveness. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord*. 17(11):631–36

- Thorleifsson G, Walters GB, Gudbjartsson DF, Steinthorsdottir V, Sulem P, et al. 2009. Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat. Genet.* 41(1):18–24
- Timpson NJ, Emmett PM, Frayling TM, Rogers I, Hattersley AT, et al. 2008. The fat mass- and obesity-associated locus and dietary intake in children. *Am. J. Clin. Nutr.* 88(4):971–78
- Tresaco B, Bueno G, Pineda I, Moreno LA, Garagorri JM, Bueno M. 2005. Homeostatic model assessment (HOMA) index cut-off values to identify the metabolic syndrome in children. *J. Physiol. Biochem.* 61(2):381–88
- Trovato GM, Castro A, Tonzuso A, Garozzo A, Martines GF, et al. 2009. Human obesity relationship with Ad36 adenovirus and insulin resistance. *Int. J. Obes. (Lond).* 33(12):1402–9
- Trovato GM, Martines GF, Trovato FM, Pirri C, Pace P, et al. 2012. Adenovirus-36 seropositivity enhances effects of nutritional intervention on obesity, bright liver, and insulin resistance. *Dig. Dis. Sci.* 57(2):535–44
- Uberos J, Molina-Carballo A, Fernández-Puentes V, Rodríguez-Belmonte R, Muñoz-Hoyos A. 2010. Overweight and obesity as risk factors for the asymptomatic carrier state of *Neisseria meningitidis* among a paediatric population. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 29(3):333–34
- Unger TJ, Calderon GA, Bradley LC, Sena-Esteves M, Rios M. 2007. Selective deletion of *Bdnf* in the ventromedial and dorsomedial hypothalamus of adult mice results in hyperphagic behavior and obesity. *J. Neurosci.* 27(52):14265–74
- Van Vliet-Ostapchouk J V, Hofker MH, van der Schouw YT, Wijmenga C, Onland-Moret NC. 2009. Genetic variation in the hypothalamic pathways and its role on obesity. *Obes. Rev.* 10(6):593–609
- Vander Wal JS, Huelsing J, Dubuisson O, Dhurandhar N V. 2013. An observational study of the association between adenovirus 36 antibody status and weight loss among youth. *Obes. Facts.* 6(3):269–78
- Vangipuram SD, Sheele J, Atkinson RL, Holland TC, Dhurandhar N V. 2004. A Human Adenovirus Enhances Preadipocyte Differentiation. *Obes. Res.* 12(5):770–77
- Vangipuram SD, Yu M, Tian J, Stanhope KL, Pasarica M, et al. 2006. Adipogenic human adenovirus-36 reduces leptin expression and secretion and increases glucose uptake by fat cells. *Int. J. Obes.* 31(1):87–96
- Vogel CIG, Boes T, Reinehr T, Roth CL, Scherag S, et al. 2011. Common variants near *MC4R*: exploring gender effects in overweight and obese children and adolescents participating in a lifestyle intervention. *Obes. Facts.* 4(1):67–75
- Wang H, Dong S, Xu H, Qian J, Yang J. 2012. Genetic variants in *FTO* associated with metabolic syndrome: a meta- and gene-based analysis. *Mol. Biol. Rep.* 39(5):5691–98
- Wang P, Yang F-J, Du H, Guan Y-F, Xu T-Y, et al. 2011. Involvement of leptin receptor long isoform (*LepRb*)-*STAT3* signaling pathway in brain fat mass- and obesity-associated (*FTO*) downregulation during energy restriction. *Mol. Med.* 17(5-6):523–32

- Wang ZQ, Cefalu WT, Zhang XH, Yu Y, Qin J, et al. 2008. Human adenovirus type 36 enhances glucose uptake in diabetic and nondiabetic human skeletal muscle cells independent of insulin signaling. *Diabetes*. 57(7):1805–13
- Warrington NM, Howe LD, Paternoster L, Kaakinen M, Herrala S, et al. 2015. A genome-wide association study of body mass index across early life and childhood. *Int. J. Epidemiol.* 44(2):700–712
- Wen W, Zheng W, Okada Y, Takeuchi F, Tabara Y, et al. 2014. Meta-analysis of genome-wide association studies in East Asian-ancestry populations identifies four new loci for body mass index. *Hum. Mol. Genet.* 23(20):5492–5504
- Whitaker RC, Wright JA, Pepe MS, Seidel KD, Dietz WH. 1997. Predicting obesity in young adulthood from childhood and parental obesity. *N. Engl. J. Med.* 337(13):869–73
- Wiegand S, Maikowski U, Blankenstein O, Biebermann H, Tarnow P, Grüters A. 2004. Type 2 diabetes and impaired glucose tolerance in European children and adolescents with obesity -- a problem that is no longer restricted to minority groups. *Eur. J. Endocrinol.* 151(2):199–206
- Willer CJ, Speliotes EK, Loos RJF, Li S, Lindgren CM, et al. 2009. Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat. Genet.* 41(1):25–34
- Williams DE. 2005. Prevalence of Impaired Fasting Glucose and Its Relationship With Cardiovascular Disease Risk Factors in US Adolescents, 1999-2000. *Pediatrics*. 116(5):1122–26
- Xu B, Goulding EH, Zang K, Cepoi D, Cone RD, et al. 2003. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat. Neurosci.* 6(7):736–42
- Xu L, Li M, Yin J, Cheng H, Yu M, et al. 2012. Change of Body Composition and Adipokines and Their Relationship with Insulin Resistance across Pubertal Development in Obese and Nonobese Chinese Children: The BCAMS Study. *Int. J. Endocrinol.* 2012:389108
- Yamada T, Hara K, Kadowaki T. 2012. Association of adenovirus 36 infection with obesity and metabolic markers in humans: a meta-analysis of observational studies. *PLoS One*. 7(7):e42031
- Yin J, Li M, Xu L, Wang Y, Cheng H, et al. 2013. Insulin resistance determined by Homeostasis Model Assessment (HOMA) and associations with metabolic syndrome among Chinese children and teenagers. *Diabetol. Metab. Syndr.* 5(1):71
- Zarelli VE, Dawid IB. 2013. Inhibition of neural crest formation by Kctd15 involves regulation of transcription factor AP-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110(8):2870–75
- Zhao J, Bradfield JP, Li M, Wang K, Zhang H, et al. 2009. The role of obesity-associated loci identified in genome-wide association studies in the determination of pediatric BMI. *Obesity (Silver Spring)*. 17(12):2254–57
- Zhao J, Bradfield JP, Zhang H, Sleiman PM, Kim CE, et al. 2011. Role of BMI-associated loci identified in GWAS meta-analyses in the context of common childhood obesity in European Americans. *Obesity (Silver Spring)*. 19(12):2436–39
- Zhou D, Liu H, Zhou M, Wang S, Zhang J, et al. 2012. Common variant (rs9939609) in the FTO gene is associated with metabolic syndrome. *Mol. Biol. Rep.* 39(6):6555–61

- Zhu X, Zhou A, Dey A, Norrbom C, Carroll R, et al. 2002. Disruption of PC1/3 expression in mice causes dwarfism and multiple neuroendocrine peptide processing defects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99(16):10293–98
- Zimmet P, Alberti KGM, Kaufman F, Tajima N, Silink M, et al. 2007. The metabolic syndrome in children and adolescents - an IDF consensus report. *Pediatr. Diabetes.* 8(5):299–306
- Zlatohlavek L, Vrablik M, Motykova E, Ceska R, Vasickova L, et al. 2013. FTO and MC4R gene variants determine BMI changes in children after intensive lifestyle intervention. *Clin. Biochem.* 46(4-5):313–16
- Zobel DP, Andreasen CH, Grarup N, Eiberg H, Sørensen TIA, et al. 2009. Variants near MC4R are associated with obesity and influence obesity-related quantitative traits in a population of middle-aged people: studies of 14,940 Danes. *Diabetes.* 58(3):757–64
- Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, et al. 2001. Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science.* 293(5529):493–98