



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Mgr Kamila Rydzewska

Analiza związku inwersji genetycznej 16p11.2 z predyspozycją do wystąpienia otyłości i nadwagi w populacji Polski.

Association studies between the genetic inversion 16p11.2 and predisposition to obesity and overweight in the Polish population.

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu

Dyscyplina nauki medyczne

Promotor: dr hab. n. med. Jeremy Clark, prof. PUM
Promotor pomocniczy: dr.n.med. Thierry van de Wetering

SZCZECIN 2023

Podziękowania

Dear dr hab. n. med. Jeremy Clark, prof. PUM,

I would like to thank you sincerely for your time which you have spend with me to establish this thesis and also for your patience as it took me a while to finish this. Without your guidance and motivation I would never have finished it. Thank you very much to be my mentor and advisor.

Dear dr.n.med. Thierry Van de Wetering,

I would like to thank you for your support and readiness to help at every moment of my scientific path. Thank you for the time devoted to studying R, for the time spent on preparing the results for the master's thesis, from which this thesis is a continuation, and for having fun during our all meetings.

Drogi Prof. dr hab. n. med. Andrzej Ciechanowiczu,

Chciałabym podziękować za wsparcie i pomoc merytoryczną podczas pisania pracy. Panie Profesorze, wiele razy uratował Pan beznadziejne sytuacje i zawsze znalazł rozwiązanie. Dziękuję również za możliwość odbycia studium doktoranckiego w Zakładzie Biochemii Klinicznej i Molekularnej, jako że bez Pana zgody nie byłabym w tym miejscu, w którym jestem teraz.

Drogi Konradzie Podsiadło,

Dziękuję Ci z całego serca, że byłeś razem ze mną w drodze do zdobycia upragnionego tytułu naukowego. Dziękuję za pomoc przy wyskakujących błędach w R, za noszenie dokumentów do podpisu czy za wsparcie mentalne podczas trudnych momentów. Bardzo się cieszę , że to z Tobą mogłam przejeść tą drogę

Spis treści

Podziękowania	1
1. Wprowadzenie	4
1.1 Inwersja chromosomu.	4
1.1.1 Odkrycie.	4
1.1.2 Znaczenie w ewolucji.	4
1.1.3 Przykłady inwersji chromosomu w populacji.	6
1.2 Otyłość	11
1.2.1 Przyczyny i skutki.	11
1.2.2 Otyłość, a rak.	15
1.2.3 Metody Terapeutyczne	18
2. Metodologia	20
2.1. Pochodzenie materiału.	20
2.2 Izolacja DNA.	20
2.3. Genotypowanie	20
2.4. Część Bioinformatyczna.	21
2.4.1 Inwersja chromosomu 16.	21
2.4.2 Gen TUFM.	29
2.4.3 Gen SH2B1.....	30
2.4.4 Gen CCDC101.....	31
2.4.5 Gen APOB48R.	32
2.4.6 Gen SPNS1.....	34
2.4.7 Gen SULT1A4.....	36
2.5. Statystyka.	37
3. Wyniki	40
3.1Charakterystyka grupy badanej.....	40
3.2 Analiza obszaru inwersji genetycznej na chromosomie 16 i BMI.....	47
3.3 Analiza genu TUFM i BMI.....	54
3.4 Analiza genu SH2B1 i BMI.	62
3.5 Analiza genu CCDC101 i BMI.	64
3.6 Analiza genu APOB48R i BMI.....	73
3.7 Analiza genu SPNS1 i BMI.	76
3.8 Analiza genu SULT1A1 i BMI.	82
4. Dyskusja.....	86

4.1 Analiza związku inwersji genetycznej 16p11.2 oraz genów leżących w obrębie z predyspozycją do wystąpienia otyłości i nadwagi.	86
4.1.1 Obszar inwersji chromosomu 16.	86
4.1.2 Gen TUFM.	86
4.1.3 GEN SH2B1.	87
4.1.4 Gen CCDC101 (SGF29).	87
4.1.5 Gen APOB48R.	88
4.1.6 Gen SPNS1.	88
4.1.7 Gen SULT1A1.	89
4.2 Otyłość a genetyka.	90
4.3 Chromosom 16 i choroby.	93
4.3.1 Ostra Białaczka Szpikowa.	93
4.3.2 Delecja 16p11.2.	94
4.3.3 Duplikacja 16p.11.2.	96
4.4 Inne efekty związane z inwersją chromosomu.	97
4.5 Limitacje badania.	104
4.6 Wnioski.	105
Streszczenie	106
Abstract	109
Bibliografia	112

1. Wprowadzenie

1.1 Inwersja chromosomu.

1.1.1 Odkrycie.

Inwersja chromosomu została odkryta ponad sto lat temu i była pierwszym zbadanym rodzajem mutacji genetycznej. We wrześniu 1913 roku badacz A. H. Sturtevant skrzyżował samicę *Drosophila* z samcem z mutacją na chromosomie 2. Analizie poddano wszystkich potomków płci żeńskiej i wykazano, że w 99% przypadków nie doszło do genetycznej rekombinacji, mimo że takie mutacje zwykle wykazywały rekombinację w 37% przypadków. Mutacja była dalej analizowana i wynik został potwierdzony, pokazując dramatyczny wpływ na transmisję, w której inwersja heterozygotyczna tłumiała rekombinację. [1] Przez następne pół wieku, zainspirowany odkryciem Sturtevanta, Dobzhansky wraz ze swoim zespołem badał wiele polimorfizmów i inwersji u gatunków *Drosophila*. [2] Niestety, po znaczącym rozwoju biochemii i biologii molekularnej po 1970 roku, badania nad inwersjami w dużej mierze zniknęły w nowym natłoku fascynujących odkryć z tych dziedzin.

1.1.2 Znaczenie w ewolucji.

Inwersje to zróżnicowana klasa mutacji chromosomalnych. Większość z nich jest mała (<1 kbp), a inne mogą mieć kilka megapar zasad i obejmują kilka procent całego genomu lub nawet setki lub tysiące genów. Istnieją dwa rodzaje inwersji: po pierwsze, istnieją inwersje perycentryczne, które zawierają centromery, a po drugie, inwersje paracentryczne, które ich nie zawierają. W obu typach inwersji chromosom pęka w dwóch miejscach, środkowy fragment jest obracany o 180°, a następnie ponownie włączany. Inwersje paracentryczne występują w przyrodzie znacznie częściej niż inwersje pericentryczne. W wielu przypadkach nie ma zmian w zawartości genetycznej odwróconych i nieodwróconych chromosomów - zmienia się tylko liniowe uporządkowanie zasad DNA. [3]

Kluczowym ewolucyjnym skutkiem inwersji wydaje się być tłumienie rekombinacji. Tłumienie rekombinacji u potomków wynika z utraty gamet z niezrównoważonymi chromosomami, które powstają w wyniku rekombinacji. Duże inwersje wykazują bardzo

niskie wskaźniki rekombinacji jako heterozygoty, co wynika z podwójnego crossing-over, mimo wszystko są one i tak znacznie niższe niż u homozygot. [4] Inwersje ewoluują jak każda inna mutacja, np. przez dobór naturalny lub dryf. Wiele inwersji, zwłaszcza małych, które są ustalone u poszczególnych gatunków, może ewoluować w sposób neutralny, jeśli nie ma genów podlegających selekcji.

Różne orientacje inwersji mogą być korzystne lub nie, podobnie jak w przypadku innych mutacji. Inwersje mogą generować problemy strukturalne z mejozą, podobnie jak w przypadku niektórych inwersji perycentrycznych. [5] Dodatkowo punkt przzerwania może przerwać otwartą ramkę odczytu genu lub zmienić ekspresję genu. Konsekwencje tego mogą być szkodliwe, jak w niektórych chorobach genetycznych występujących u ludzi, ale w innych przypadkach mogą skutkować mutacją adaptacyjną. [3] Dobór naturalny może również działać na inwersję, jeśli niesie jeden lub więcej wybranych alleli. Inwersje sekwencji również odegrały ważną rolę w ewolucji chromosomów płciowych. Wydaje się, że seria inwersji oddzieliła chromosom Y od chromosomu X, tworząc zasadniczo jednostkę genetyczną bez rekombinacji. [6]

Innym ważnym zagadnieniem jest implikacja inwersji w procesie specjacji. Intrygujące jest to, że tempo ewolucji chromosomów [tj. szybkość, z jaką chromosomy przechodzą zmiany strukturalne] i ilość specjacji wydają się być skorelowane, chociaż nie mówi nam to, który czynnik powoduje który, ani czy oba są napędzane przez trzecią zmienną. [7] Niektórzy badacze uważają, że inwersje mogą być ważne dla izolowania genów odpowiedzialnych za słabą sprawność fizyczną. Dzięki temu mechanizmowi inwersje eliminowałyby geny warunkujące słabe cechy do puli nerekombinacyjnej. Jednak w sprzyjających warunkach demograficznych (np. częsta kolonizacja i wymieranie) modele pokazują, że populacje mogą naprawiać przesunięcia chromosomalne, które znacząco przyczyniają się do niepełnosprawności. Niemniej jednak spodziewamy się, na podstawie badań inwersji, że mogą one dostarczyć regionów do akumulacji pozytywnie wybranych różnic, a także genów, które powodują niezgodność między gatunkami. [8]

Alternatywna hipoteza głosi, że inwersje były faworyzowane ze względu na różnice adaptacyjne, które istniały wcześniej w niektórych loci obecnie zawartych w inwersjach. [3] Wyraźny znak, że inwersje są zaangażowane w adaptację, wynika z geograficznej zmienności ich częstości. Lokalna adaptacja to sytuacja, w której różne geny są preferowane w różnych środowiskach. Inwersja, która wychwytyje dwa lub więcej alleli,

które są przystosowane do lokalnych warunków środowiskowych, ma selektywną przewagę, która może powodować rozprzestrzenianie się. Efekt ten wynika z tłumionej rekombinacji: nowa inwersja przenosi tylko lokalnie przystosowane allele. Żadna epistaza (interakcja genów) nie jest potrzebna, aby inwersja uzyskała przewagę, co oznacza, że ten lokalny mechanizm adaptacyjny może działać nawet wtedy, gdy loci dostosowują się do różnych zmiennych środowiskowych. Jest to jeden z powodów, dla których lokalny mechanizm adaptacyjny może działać znacznie częściej niż mechanizmy z pozostałych hipotez. Hipotezy te sugerują, że rozprzestrzenianie się inwersji zachodzi, ponieważ uniemożliwiają one rekombinację zestawów alleli, które są korzystne w określonym środowisku. [9]

1.1.3 Przykłady inwersji chromosomu w populacji.

Jak już wcześniej wspomniano inwersje chromosomu mogą mieć pozytywne oraz negatywne skutki na nasz organizm. Mogą predysponować do pozytywnej zmiany adaptacyjnej czy wręcz do pojawienia się choroby. W tym podrozdziale omówimy parę przykładów jak pojawienie się inwersji oddziałuje na człowieka.

Pierwszym omawianym przykładem jest inwersja na chromosomie 9, który ma najwyższy poziom zmienności strukturalnej. Chociaż klasyfikuje się je jako niewielkie rearanżacje chromosomalne, które nie korelują z nieprawidłowymi fenotypami, wiele doniesień łączy te inwersje z niższą płodnością, nawracającymi poronieniami i nieprawidłowymi fenotypami klinicznymi. [10] [11] Nosiciele takich inwersji są narażeni na ryzyko rozwoju nieprawidłowych gamet podczas mejozy, co może skutkować nieprawidłową ciążą lub niepłodnością. Częstość występowania tych inwersji wynosi około 1,98% w ogólnej populacji USA, z wyższą częstością występowania u Afroamerykanów. W 2007 roku H. Mozdarani et al [11] opublikowali badanie na ten temat. Populacja składała się z irańskich par leczonych w klinice leczenia niepłodności. Przebadano łącznie 601 pacjentek z co najmniej 3-letnią niepłodnością. Wiek kobiet wahał się od 21 do 38 lat, a mężczyzn od 25 do 42 lat. Stosując technikę cytogenetyczną na 601 pacjentach, u 15 (2,5%) stwierdzono inwersję na chromosomie 9 (p11q12). Inwersje zaobserwowano tylko u 1 kobiety (0,33%), podczas gdy u mężczyzn w 14 przypadkach (4,69%). Częstość inwersji chromosomu 9 u mężczyzn była istotnie wyższa niż u kobiet ($p < 0,05$). Całkowita średnia inwersja u mężczyzn i kobiet w tym badaniu (2,5%) nie była istotnie wyższa niż w normalnej populacji, a zatem wskazywała na

idiopatyczną, a zatem niewyjaśnioną niepłodność u mężczyzn. Pomimo tego, że inwersja była znacznie bardziej powszechna u płci męskiej, ale nie mogła być powiązana z niepłodnością to nadal istnieje teoria, że inwersja na chromosomie 9 może powodować problemy kliniczne u potomstwa nosicieli i bezpłodność w wyniku nieznanego mechanizmu związanego z płcią.

Kolejna inwersja, którą chciałbym opisać, również związana jest z tematyką płodności, ale tym razem inwersja przyczyniła się do wzrostu płodności w badanej grupie. Grupa naukowców zbadała inwersję chromosomy 17, a dokładnie region 17q21.31 o rozmiarze 900kb, który występuje u około 21% Europejczyków. [12] Region ten zawiera kilka ważnych genów, takich jak CRHR1, który koduje receptor 1 czynnika uwalniającego kortykotropinę lub białko CRF (czynnik uwalniający kortykotropinę) i gen MAPT, który koduje białko tau związane z mikrotubulami i który został już przetestowany z haplotypami H1 i H2. Podczas badania genotypowano 29137 Islandczyków, w tym 16959 kobiet i 12178 mężczyzn urodzonych w latach 1925-1965. Liczbę potomstwa porównano z liczbą kopii wariantu H2 z uwzględnieniem płci i wieku. Wyniki sugerowały, że im więcej kopii H2 u osób pochodzenia islandzkiego, tym większa liczba potomstwa. Niestety teza ta, nie może być w pełni potwierdzona jako zjawisko ogólne, ponieważ została postawiona na określonej grupie badawczej w latach, w których liczba dzieci była zazwyczaj wysoka. Jednak dało nam to możliwy kierunek dalszych badań.

Następna inwersja, którą chciałbym szerzej opisać jest inwersja chromosomu 16, która związana jest z występowaniem otyłości oraz astmy. [13] Opisana poniżej praca stała się główną inspiracją do powstania tej pracy doktorskiej. Badania epidemiologiczne wykazały, że osoby otyłe są bardziej narażone na astmę niż osoby nieotyle, a objawy astmy mogą ulec poprawie po utracie wagi. Osoby otyłe z astmą mają cięższe objawy i gorszą odpowiedź na leczenie glikokortykosteroidami. Propozycje wspólnego występowania tych dwóch zaburzeń obejmują choroby współistniejące, takie jak refluks żołądkowo-przełykowy lub zaburzenia oddychania związane ze snem oraz wspólne mechanizmy patogenetyczne, takie jak ogólnoustrojowy stan zapalny, zwiększony stres oksydacyjny lub dysfunkcja hormonalna. Czynniki genetyczne mogą być również zaangażowane w współwystępowanie astmy i otyłości. Badania wykazały polimorfizmy w regionie chromosomu 16p11.2, które są związane z otyłością lub wskaźnikiem masy ciała (BMI), jak również z fenotypami astmy. Funkcjonalne SNP znaleziono w genie kodującym białko adaptorowe SH2B 1 które bierze udział w sygnalizacji leptyny,

hormonu odpowiedzialnego za odpowiedź immunologiczną komórek T. SNP zlokalizowany w pobliżu locus IL27 (interleukina-27) był również związany z podatnością na astmę u dorosłych i dzieci. Badania asocjacyjne w badaniu kliniczno-kontrolnym wykazały, że inwersja około 0,45 Mbp w 16p11.2 dostarczyła genetycznych podstaw współpodatności na astmę i otyłości w Europie. Wszystkie osoby wybrane do badań eksploracyjnych i walidacyjnych były pochodzenia europejskiego, a wszystkie analizy zostały dostosowane np. do płci, aby rozwiązać ewentualne zamieszanie wynikające z rozwarstwienia populacji. Zidentyfikowano genotypy w 24 reprezentatywnych SNP'ach, które mogą działać jako markery haplotypów inwersji w allelach NI i I. Stwierdzono, że częstość alleli 16p11.2 jest bardzo niska u Afrykanów i mieszkańców Azji Wschodniej, ale u Europejczyków była wyższa, z gradacją rosnącą z południa na północ. Kiedy allel NI pojawił się u ludzi około 1,35 miliona lat temu, mógł zapewnić lepsze warunki do tego, by aktywność fizyczna stała się najpowszechniejsza w Afryce. Jednak po migracji z Afryki 50000 do 100000 lat temu, allel I mógł zapewnić swoją korzyść głównie populacjom migrującym dalej na północ w Europie. Podobne rozwarstwienie populacji pochodzenia afrykańskiego i niezwykły dryf genetyczny lub selektywne przemiatanie odnotowano dla polimorfizmu inwersji 17q21.31. [12] Rozmieszczenie alleli 16p11.2 pokazano na ryc. 1.



Rycina 1. Częstości haplotypów inwersji 16p11.2 , a światowe położenie geograficzne.

Źródło: González JR, Cáceres A, Esko T, Cuscó I, Puig M, Esnaola M, Reina J, Siroux V, Bouzigon E, Nadif R, Reinmaa E, Milani L, Bustamante M, Jarvis D, Antó JM,

Sunyer J, Demenais F, Kogevinas M, Metspalu A, Cáceres M, Pérez-Jurado LA. A Common 16p11.2 Inversion Underlies the Joint Susceptibility to Asthma and Obesity. *American Journal of Human Genetics*. 2014 Mar 6; 94(3): 361-372

Allel inwersji I 16 p11.2 ma istotny wpływ ochronny na ryzyko astmy, który jest silniejszy w przypadku współistnienia astmy i otyłości. [13] Można też wyciągnąć wnioski w odwrotnym kierunku, sugerując, że najczęstszy allel NI przyczynia się do podatności na powszechne występowanie astmy i otyłości. Warto zauważyć, że ten polimorfizm inwersyjny odpowiada za 3% wspólnych składowych wariancji w obrębie astmy i otyłości, a ryzyko populacyjne wynosi 39,7%. Wpływ inwersji na tę powszechną podatność prawdopodobnie zależy od jej silnego wpływu na ekspresję kilku sąsiednich genów o funkcjach regulacyjnych zarówno z bilansem energetycznym, takich jak APOB48R, SH2B1 i TUFM, jak i z odpornością, takich jak IL27 i TUFM.

Podsumowując nierównomierne rozmieszczenie w różnych populacjach świata, zmienność SNP w różnych orientacjach inwersji chromosomu 16 może wynikać z dryfu genetycznego lub selekcji adaptacyjnej. Badania potwierdziły, że astma i otyłość mogą mieć wspólną podstawę genetyczną i że inwersja około 0,45 Mbp w 16p11.2, być może w połączeniu z innymi inwersjami genomowymi, jest związana z podatnością na choroby, którą można określić za pomocą zastępczych haplotypów SNP.

W tej pracy został poddany analizie zarówno obszar inwersji chromosomu 16 jak i wybrane geny, leżące w obrębie tej zmiany. Pierwszym z nich jest APOB48R, który koduje receptor makrofagów apolipoproteiny B48, który wiąże się z apolipoproteiną B48 dietetycznych lipoprotein bogatych w triglicerydy i dostarcza niezbędnych lipidów, witamin rozpuszczalnych w tłuszczach i innych składników odżywczych do komórek siateczkowo-śródbłonkowych. Tłuszcz dietetyczny indukuje akumulację lipidów wraz z transkrypcją APOB48R w krążących monocytach. [14] Następnie SH2B1, który koduje członka rodziny mediatorów zawierającej domenę SH2. Kodowane białko pośredniczy w aktywacji różnych kinaz i może działać w sygnalizacji receptora cytokin i czynnika wzrostu oraz w transformacji komórkowej. Choroby związane z SH2B1 obejmują zespół ciężkiej otyłości i insulinooporności o wczesnym początku spowodowany niedoborem SH2B1 i zespół delecji chromosomu 16P11.2. [15] Kolejnym genem jest TUFM, którego recesywne mutacje powodują złożony niedobór fosforylacji oksydacyjnej, skutkujący kwasicą mleczanową i śmiertelną encefalopatią, bierze udział w translacji białek w

mitochondriach, a także w regulacji interferonu typu 1 i autofagii, osłabiając odpowiedź zapalną na infekcje. [16] Dowody na adaptacyjne podwyższenie podstawowej przemiany materii odnotowano w populacjach północnych (okołobiegunowych). Biorąc pod uwagę pozytywną selekcję alleli I z widocznym gradientem z południa na północ u Europejczyków i niezwykle wkład w ekspresję TUFM, poprawę funkcji mitochondriów i podstawowego bilansu energetycznego związanego z wyższą ekspresją TUFM alleli I mogło dać przewagę adaptacyjną zimnym klimatom dla populacji północnych. Ponadto wykazano, że nadekspresja TUFM może uchronić zmutowane mitochondrialne tRNA przed degradacją, działając jako supresor defektów mitochondrialnych. [17] Jest to kolejny potencjalny czynnik przyczyniający się do pozytywnej selekcji, ponieważ stało się oczywiste, że mutacje somatyczne w mitochondrialnych genach ludzkiego tRNA są związane z zaburzeniami zwyrodnieniowymi, starzeniem się i rakiem. [18] Kolejny gen to SPNS1, który koduje białko związane z transportem sfingolipidów. Przewiduje się, że bierze udział w transporcie lipidów i transporcie przez błonowy. Również związany z utrzymaniem optymalnego pH w lizosomie. [19] Kolejny to SULT1A1, kodujący białko związane z sulfotransferazą. SULT1A1 jest wszechobecny w tkankach ludzkich i bierze udział w metabolizmie, bioaktywacji i detoksykacji środowiskowych i dietetycznych prokarcynogenów, jak również wielu hormonów steroidowych, w tym estrogenów. [20] Ostatnim genem jest CCDC101 znany również pod nazwą SGF29. CCDC101 jest podjednostką 2 histonowych kompleksów acetylotransferazy. Związany jest również z organizacją chromatyny. [21]

Nie wszystkie geny są dokładnie zbadane oraz mają powiązanie bezpośrednio z otyłością natomiast wszystkie leżą w obrębie obszaru inwersji chromosomu 16, dlatego postanowiłam również zbadać czy wpływają one na otyłość i nadwagę w populacji Polskiej.

1.2 Otyłość

1.2.1 Przyczyny i skutki.

Otyłość to zaburzenie charakteryzujące się nieproporcjonalnym wzrostem masy ciała w stosunku do wzrostu, głównie na skutek gromadzenia się tkanki tłuszczowej. Otyłość jest uważana za pandemię obecnego stulecia przez Światową Organizację Zdrowia (WHO). [22] Na całym świecie otyłość prawie potroiła się od 1975 r. do 2016 r. Ponad 1,9 miliarda dorosłych w wieku 18 lat i starszych (39% światowej populacji) miało nadwagę. Spośród tych osób ponad 650 milionów (13% całej populacji) było otyłych. W 2016 roku ponad 340 milionów dzieci i młodzieży w wieku 5-19 lat miało nadwagę lub otyłość, a w 2020 roku 39 milionów dzieci poniżej 5 roku życia miało nadwagę lub otyłość. [23] Częstość występowania otyłości różni się również w zależności od statusu społeczno-ekonomicznego, z wolniejszym tempem wzrostu BMI w krajach o wysokich dochodach i niektórych krajach o średnich dochodach. Podczas gdy otyłość była kiedyś uważana za problem krajów o wysokich dochodach, wskaźniki zachorowalności dzieci otyłych lub z nadwagą w krajach o wysokich dochodach, w tym w Stanach Zjednoczonych, Szwecji, Danii, Norwegii, Francji, Australii i Japonii, spadły lub osiągnęły poziom plateau od początku XXI wieku. [24]

Podstawowe przyczyny otyłości również pozostają nieco kontrowersyjne. Aktualne zalecenia zdrowotne dotyczące zwalczania otyłości opierają się na podstawowej właściwości fizjologicznej, polegającej na tym, że gromadzenie się tłuszczu jest napędzane przez brak równowagi energetycznej między spożywanymi a wydatkowanymi kaloriami. Epidemia otyłości była w dużej mierze napędzana zwiększoną energią wynikającą z większej dostępności wysoce satysfakcjonującej i wysokoenergetycznej żywności. Dieta oraz różne czynniki społeczne, ekonomiczne i środowiskowe związane z zaopatrzeniem w żywność mają istotny wpływ na zdolność pacjenta do osiągnięcia równowagi. [25] W 13-letnim badaniu kontrolnym przeprowadzonym na 3000 młodych ludzi, ci, którzy spożywali znacznie więcej fast-foodów, ważyli średnio ~6 kg więcej i mieli większy obwód talii niż ci, którzy spożywali fast-foody w najmniejszym stopniu. Stwierdzono również, że częściej występują u nich problemy zdrowotne związane z ujemną wagą, takie jak podwyższone trójglicerydy. [26]

Historia rodziny, styl życia i czynniki psychologiczne również wpływają na skłonności do otyłości. Na prawdopodobieństwo otyłości może mieć wpływ natura i wychowanie, zwiększane przez genetykę rodziny lub styl życia. Dziecko z jednym otyłym rodzicem jest trzykrotnie bardziej narażone na otyłość w wieku dorosłym, natomiast gdy oboje rodziców jest otyłych, to dziecko ma 10-krotne ryzyko przyszłej otyłości. Przekrojowe badanie obserwacyjne 260 dzieci (139 dziewczynek, 121 chłopców, w wieku 2,4 i 17,2 lat) wykazało, że wywiad rodzinny w kierunku chorób kardiometabolicznych i otyłości są krytycznymi czynnikami ryzyka ciężkości otyłości w dzieciństwie. [27] Prospektywne badanie 3148 chłopców w wieku szkolnym (w wieku od sześciu do dziesięciu lat) ujawniło kilka czynników ryzyka otyłości u dzieci, w tym otyłość rodziców, przekąski między posiłkami, zwłaszcza po obiedzie, brak snu (<8 godzin) i codzienne spożycie soku, napoju gazowanego, słodczy i słodkich pokarmów. [28] Jednakże rodzice nie są jedynymi inicjatorami otyłości u dzieci. Jest nim również spadek aktywności fizycznej. Czynniki, które mogły spowodować spadek aktywności fizycznej u dzieci, to między innymi wydłużenie czasu spędzanego przed konsolami do gier wideo i urządzeniami mobilnymi przy jednoczesnym ograniczeniu czasu spędzanego aktywnie lub na świeżym powietrzu. Trudno sprzeciwić się postępowi technologicznemu, ale na podstawie tych badań można stwierdzić, że takie innowacje mogą odbijać się negatywnie na zdrowiu dzieci. [29]

Kolejnym ważnym czynnikiem wpływającym na otyłość jest mikrobiom. Nasza wiedza na temat mikrobiomu jelitowego znacznie wzrosła w ostatnich latach, podobnie jak nasze zrozumienie jego zawilego związku z chorobą. Coraz więcej dowodów wskazuje, że zmiany mikrobiomu jelitowego powodują zmiany w wadze i metabolizmie żywiciela. Na przykład, w porównaniu z tymi z normalną mikroflorą jelitową, samce myszy wolne od zarazków (bez mikroflory jelitowej) miały o 42% mniej całkowitej tkanki tłuszczowej, nawet przy dziennym spożyciu o 29% więcej pokarmu. Jednak po kolonizacji mikroorganizmów jelita ślepego całkowita tkanka tłuszczowa tych myszy wzrosła o 57% a, beztłuszczowa masa ciała zmniejszyła się o 7%, dzienne spożycie pokarmu zmniejszyło się natomiast o 27%. Dalsze badanie sugerowało, że zmiany te wynikały ze zmniejszonego tempa metabolizmu, z towarzyszącym zwiększonym odkładaniem się tkanki tłuszczowej, ponieważ gęstość naczyń włosowatych w dystalnych kosmkach jelita cienkiego wzrosła o 25% po kolonizacji mikroflorą. Podobne wyniki zaobserwowano również u samic myszy. [30] Ciało ludzkie zawiera około $3,8 \times 10^{13}$ mikroorganizmów,

a większość z nich zasiedla przewód pokarmowy. Różnorodność zdrowego mikrobiomu jelitowego pozwala na funkcjonalną redundancję, w której wiele drobnoustrojów może pełnić podobne funkcje. Normalnie mikroflora jelitowa pełni istotne korzystne role u gospodarza, w tym bierze udział w metabolizmie węglowodanów i lipidów, syntezie witamin i aminokwasów, proliferacji komórek nabłonka, ochronie przed patogenami i modulacji hormonów. Bakterie jelitowe mogą również rozkładać niestrawne cząsteczki, takie jak oligosacharydy ludzkiego mleka i polisacharydy roślinne. [31] Wykazano, że brak równowagi populacji drobnoustrojów („dysbioza”) wiąże się z wieloma chorobami, w tym zaburzeniami neurologicznymi, nieswoistymi zapaleniami jelit, niedożywieniem, rakiem, cukrzycą i otyłością. [32]

Otyłość jest zwykle diagnozowana poprzez oszacowanie wskaźnika masy ciała (BMI), który jest obliczany jako stosunek masy ciała (kg) do wzrostu do kwadratu (m^2), co pozwala lekarzom klasyfikować osoby według stopnia od nadwagi do olbrzymiej otyłości. [15] Jednak ten prosty i użyteczny wskaźnik nie ocenia zmian metabolicznych często związanych z otyłością, które z kolei są ściśle związane z występowaniem insulinooporności w tkankach obwodowych [33] lub zaburzeniami immunologicznymi występującymi w konsekwencji powstania procesu zapalnego niskiego stopnia, wywodzącego się z aktywacji wrodzonego układu odpornościowego [34]. Ten ostatni proces prowadzi również do insulinooporności i zmiany metabolizmu glukozy i lipidów [35], a także wydzielania licznych cytokin prozapalnych [36] oraz czynników zaangażowanych w angiogenezę i krzepnięcie krwi [37]. Dodatkowo hipertrofia adipocytów indukuje gromadzenie się reaktywnych form tlenu z powodu dysfunkcji retikulum endoplazmatycznego [38] i aktywacji kaskad sygnalizacji stanu zapalnego komórek [39]. Zaproponowano, że wiele adipokin i czynników zapalnych może być biomarkerami otyłości. [40] W rzeczywistości u osób otyłych ekspresja wielu genów związanych z metabolizmem komórkowym i produkcją adipokin jest znacząco zmieniona. [41] W populacji otyłych klinicyści mogą rozróżnić osoby otyłe metabolicznie zdrowe oraz osoby otyłe metabolicznie niezdrowe. Podwyższone ciśnienie krwi, hiperlipidemia, hiperglikemia, hiperurykemia i zwiększona obwodowa insulinooporność są często zgłaszane u pacjentów metabolicznie niezdrowych. [42]

Istnieją poważne kontrowersje dotyczące tego, czy otyłość powinna być uważana za chorobę, natomiast jej skutki są na tyle poważne, że nigdy nie można jej bagatelizować. [43]

Niektóre z chorób współistniejących związanych z nadwagą i otyłością obejmują nowotwory (rak piersi, endometrium, jajnika, jelita grubego, przełyku, nerek, trzustki, prostaty), cukrzyce typu 2, nadciśnienie, udar, chorobę wieńcową, zastoinowa niewydolność serca, astmę, przewlekły ból pleców, chorobę zwyrodnieniową stawów, zatorowość płucną, choroby pęcherzyka żółciowego, a także zwiększone ryzyko niepełnosprawności. Wszystko to prowadzi do ponad trzech milionów zgonów rocznie na całym świecie. [44] Istnieje również spójny związek między nadwagą i otyłością w dzieciństwie i okresie dojrzewania ze zwiększonym ryzykiem zarówno przedwczesnej zachorowalności, jak i śmiertelności, zwłaszcza chorobowości sercowo-metabolicznej. [45] Badania potwierdzają również, że nadwaga i otyłość jest głównym problemem mniejszości w porównaniu z białymi, biednych w porównaniu z bogatymi oraz kobiet w porównaniu z mężczyznami. [46] Nadwaga i otyłość również niosą ze sobą znaczne obciążenie zdrowotne i będą miały znaczący wpływ na wydatki na zdrowie. Otyłość ma silny związek z występowaniem przewlekłych problemów medycznych, upośledzeniem jakości życia związanej ze zdrowiem oraz zwiększeniem wydatków na opiekę zdrowotną i leki. [47]

Otyłość ma również wpływ na zdrowie psychiczne. Dowody naukowe kładą nacisk na rosnące ryzyko niskiej samooceny, zaburzeń nastroju, zaburzeń motywacji, problemów z jedzeniem, zaburzonego obrazu własnego ciała, problemów z komunikacją międzyludzką, a wszystko to bezpośrednio lub pośrednio wpływa na jakość życia. [46] Z drugiej strony, w niektórych przypadkach doświadczanie dyskryminacji ze względu na otyłość prowadzi do rozwoju psychopatologii i złych zachowań zdrowotnych, które poprzez błędne koło nasilają przejadanie się, bulimię lub inne powiązane problemy. [48] Niektóre badania wykazały, że otyłość zarówno u mężczyzn, jak i u kobiet zwiększa ryzyko pogorszenia zdrowia seksualnego. Osoby otyłe przypisują to swojemu wyglądowi i wadze oraz często napotykają trudności w czynnościach seksualnych. Jakość życia seksualnego jest szczególnie upośledzona w przypadku kobiet otyłych. [49] W związku z tym musimy położyć nacisk na bardziej kompleksowe badania populacyjne, aby poznać wpływ nadwagi i otyłości na różne aspekty zdrowia psychicznego, w tym zaburzenia nastroju, problemy z komunikacją, samozadowolenie i jego wpływ na zdrowie seksualne. Konsekwencje współistniejących chorób fizycznych związanych z otyłością obejmują zaburzenia psychiczne i stygmatyzację doświadczaną przez otyłych pacjentów. Piętno z nadwagą i związana z nią dyskryminacja są udokumentowane we wszystkich kluczowych

obszarach życia, w tym we wzroście i rozwoju, procesie edukacyjnym, strukturze zatrudnienia i zapewnianiu opieki zdrowotnej. Osoby otyłe są najczęściej wyśmiewane przez swoich nauczycieli, lekarzy i opinię publiczną. Czasami cierpią też z powodu dyskryminacji, wyśmiewania, uprzedzeń społecznych, odrzucenia i upokorzenia. [48] Dyskryminacja związana z wagą sama w sobie wiąże się ze złymi zachowaniami zdrowotnymi, takimi jak patologiczne objadanie się, objadanie się, a nawet siedzący tryb życia i zmniejszona aktywność fizyczna, co z kolei prowadzi do większego przyrostu masy ciała. To błędne koło ponownie zwiększa ryzyko narażenia na dyskryminację ze względu na wagę. [50]

Otyłość niesie ze sobą wiele groźnych konsekwencji zarówno dla zdrowia fizycznego jak i psychicznego. W poniższym podrozdziale został opisany szerzej, związek pomiędzy otyłością, a rakiem, który jest jednym z najpoważniejszych konsekwencji tej choroby.

1.2.2 Otyłość, a rak.

Pandemie otyłości i raka stanowią główne wyzwania w zakresie opieki zdrowotnej na całym świecie. Równocześnie rośnie zachorowalność na raka, a otyłość ma być główną modyfikowalną przyczyną raka, wyprzedzając palenie. [51] Nowotwory związane z otyłością stanowią już 40% przypadków raka w USA. [52] Otyłość wiąże się ze zwiększonym ryzykiem raka w wielu różnych tkankach [53] w tym raka piersi (po menopauzie), jelita grubego, endometrium, przełyku, jajnika, wątroby, wpustu żołądka, pęcherzyka żółciowego, trzustki, nerki, oponiaka, szpiczaka mnogiego i tarczycy. [54] Badania dowodzą również, że zmniejszenie masy ciała po operacji bariatrycznej wiąże się ze zmniejszonym ryzykiem raka, szczególnie w przypadku nowotworów związanych z otyłością. [55] Szacuje się, że do 2035 r. ~ 40% przypadków raka endometrium, > 25% przypadków raka przełyku, > 20% przypadków raka nerki i ~ 20% przypadków raka wątroby na całym świecie będzie związanych z wysokim wskaźnikiem masy ciała. [56]

Nie ma wątpliwości, że otyłość zmienia fizjologię organizmu, metabolizm, proteom, transkryptom i perspektywę epigenetyczną w wielu tkankach i że zmiany te można powiązać z wieloma cechami procesu rakotwórczego. W swoim przełomowym artykule Hanahan i Weinberg zdefiniowali „cechy charakterystyczne raka”, a mianowicie właściwości, które wyznaczają komórki do rozwoju i utrzymania wzrostu guza. [57]

Podstawową właściwością komórek nowotworowych jest ich zdolność do niekontrolowanego podziału i proliferacji. W stanie otyłości poziom leptyny we krwi wzrasta w wyniku zwiększonego wydzielania z tkanki tłuszczowej. [58] Krążąca leptyna pomaga regulować apetyt, wrażliwość na insulinę i hormony, takie jak hormon tyreotropowy. Jednak leptyna wykazuje również działanie proonkogenne. Leptyna jest czynnikiem wzrostu, wiążącym się z receptorem kinazy tyrozynowej (Ob-R/LepR) i aktywującym szlaki sygnałowe JAK/STAT, ERK i PI3K/Akt. [59] Jednak leptyna nie jest jedynym czynnikiem odgrywającym rolę we wzroście guza otyłości, co zostało podkreślone w niedawnych pracach na mysich modelach gruczolakoraka trzustki, wykazujących przyspieszoną nowotworzenie u otyłych myszy z niedoborem sygnalizacji leptyny z możliwym udziałem cholecystokininy. [60] Innym promotorem wzrostu, związanym ze zwiększoną produkcją leptyny, jest estrogen, którego rola w raku piersi jest dobrze poznana. Warto zauważyć, że głównym źródłem estrogenu jest tkanka tłuszczowa, gdzie jest on wytwarzany przez enzym aromatazę, a estrogeny w surowicy są podwyższone u otyłych ludzi. [61] Status receptora estrogenowego jest wyznacznikiem leczenia raka piersi i wpływa na rokowanie. Estrogen został również powiązany z rozwojem raka endometrium i raka jelita grubego u ludzi, chociaż związek jelita grubego. [62]

Otyłości często towarzyszy hiperglikemia, dostarczająca dzielącym się komórkom więcej paliwa i wpływająca na wydzielanie czynnika wzrostu. [63] Insulina jest uwalniana w odpowiedzi na wzrost poziomu glukozy we krwi. Rzeczywiście, hormon insuliny i jego związek strukturalny, insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (IGF-1), zostały powiązane zarówno z karcynogenezą, jak i otyłością. [64] Insulina jest wytwarzana w trzustce w odpowiedzi na podwyższony poziom glukozy, podczas gdy IGF-1 jest w dużej mierze wytwarzany przez hepatocyty w odpowiedzi na hormon wzrostu. Poziom insuliny wzrasta chronicznie w otyłości oraz cukrzyca typu 2, która charakteryzuje się opornością na insulinę, a tym samym wysokim poziomem insuliny we krwi. Cukrzyca typu 2 została powiązana ze zwiększoną częstością występowania nowotworów związanych z otyłością u ludzi, w tym raka jelita grubego, wątroby, trzustki, piersi i endometrium. [65] IGF-1 został również powiązany z karcynogenezą jednakże, w przeciwieństwie do insuliny, istnieje wiele dyskusji na temat krążących całkowitych poziomów IGF-1 u otyłych ludzi. [66]

Wysoki poziom cytokiny IL-6 we krwi występuje u pacjentów z otyłością oraz u pacjentów z rakiem wątroby. [67] IL-6 jest uwalniana przez makrofagi związane z tkanką tłuszczową i stymuluje wzrost komórek w mysich modelach raka wątrobowokomórkowego poprzez aktywację STAT3, ERK i JNK oraz zmiany w AKT i mTOR. [68] Również, mniej konwencjonalne modulatory mogą działać jako stymulatory wzrostu u pacjentów z otyłością. Obejmują one pochodzące z tkanki tłuszczowej białko wiążące kwasy tłuszczowe (A-FABP). A-FABP promuje migrację i proliferację linii komórkowych raka piersi in vitro (MCF-7, E0771), a zatem może być nowym czynnikiem napędzającym proliferację w nowotworach wywołanych otyłością. A-FABP jest podwyższony w surowicy otyłych ludzi i wykazano, że promuje proliferację i inwazyjność poprzez wzmacnianie łożóg guzów sutka. [69]

W normalnych komórkach kontrola wzrostu oznacza równowagę między związkami promującymi wzrost (czynnikami wzrostu) a supresorami wzrostu. Nadmierna proliferacja, jak w raku, może oznaczać nadmierną aktywację receptorów czynnika wzrostu, albo przez nadmierną produkcję samego czynnika wzrostu, albo mutację białek w obrębie szlaków sygnałowych. Kolejną możliwością jest hamowanie supresorów wzrostu. Powszechnie uważa się, że adiponektyna jest środkiem hamującym wzrost, uwalnianym przez adipocyty, mającym zarówno działanie endokryne, jak i parakryne. Wiadomo, że adiponektyna zwiększa wrażliwość na insulinę, pomagając regulować obwodowy metabolizm glukozy i kwasów tłuszczowych [70]. Poza tym, że jest regulatorem metabolizmu, adiponektyna ma działanie przeciwzapalne i przeciwutleniające. U ludzi z otyłością krążąca adiponektyna spada nawet dziesięciokrotnie wraz ze wzrostem powierzchni trzewnej tkanki tłuszczowej. Wydaje się paradoksalne, że adiponektyna, która jest produkowana przez adipocyty, spada, gdy ilość tkanki tłuszczowej wzrasta, ale może to być spowodowane supresją przez parakryne działania TNF α . [71] Niski poziom krążącej adiponektyny jest obserwowany u ludzi z rakiem endometrium i wiąże się ze zwiększonym ryzykiem raka piersi po uwzględnieniu BMI i wieku. [72] Niektóre białka supresorowe nowotworów są zmniejszone w otyłości. Zwykle TP53 jest niestabilny w komórce, ale może być stabilizowany przez fosforylację przez AMPK, który jest aktywowany przez adiponektynę. Tak więc można by oczekiwać, że stężenie TP53 spada wraz ze spadkiem adiponektyny w otyłości, i rzeczywiście, spadek ten wydaje się być pogarszany przez leptynę w modelach komórkowych.

Zatem możemy zauważyć, że otyłość jest bardzo ważnym czynnikiem, który może wpływać na rozwój oraz przebieg choroby nowotworowej.

1.2.3 Metody Terapeutyczne

Biorąc pod uwagę brak konkretnych interwencji farmakologicznych, „modyfikacja stylu życia” pozostaje podstawą leczenia otyłości. Osobom z otyłością zaleca się utratę co najmniej 10% masy ciała poprzez połączenie diety, aktywności fizycznej i terapii behawioralnej lub modyfikacji stylu życia. [73] Znaczącą, krótkotrwałą utratę masy ciała można osiągnąć poprzez spożywanie diet z kontrolowanymi porcjami. Długoterminową kontrolę masy ciała można osiągnąć poprzez wysoki poziom aktywności fizycznej i ciągły kontakt pacjent-praktykujący. W wielu przypadkach modyfikacja stylu życia prowadzi do dramatycznej utraty masy ciała, co prowadzi do znacznego zmniejszenia ryzyka sercowo-naczyniowego. [74]

Farmakoterapię zaleca się osobom, których BMI ≥ 30 (lub BMI ≥ 27 z chorobami współistniejącymi) i które nie są w stanie schudnąć poprzez samą modyfikację stylu życia. Istnieją 4 zatwierdzone przez FDA leki na otyłość : naltrekson-bupropion (Contrave), orlistat (Xenical, Alli), liraglutyd (Saxenda) i fentermina-topiramant (Qsymia). [75] FDA zatwierdziła również agonistę MC4R-Setmelanotydu do stosowania u osób z ciężką otyłością spowodowaną niedoborem POMC, PCSK1 (konwertazy probiałkowej subtylizyny/keksyny typu 1) lub LEPR (receptora leptyny) pod koniec 2020 r. [76] Ponadto zidentyfikowano 11 różnych składników z 54 rodzin roślin, które mają potencjał przeciw otyłości. Rodziny te obejmują Celastraceae, Zingiberaceae, Theaceae, Magnoliaceae i Solanaceae [77].

Dla osób z BMI > 40 lub BMI > 35 z chorobami współistniejącymi, które nie są w stanie schudnąć poprzez modyfikację stylu życia lub farmakoterapię, inną opcją jest operacja bariatryczna lub operacja odchudzania. Standardowe operacje bariatryczne, w tym dywersja żółciowo-trzustkowa, rękawowa resekcja żołądka, (pomost żołądkowy Roux-en-Y i regulowana opaska żołądkowa, w różnym stopniu przynoszą korzyści indywidualnym profilom metabolicznym. Badania wykazały, że korzyści z chirurgii bariatrycznej wykraczają poza samą utratę wagi. Chirurgia bariatryczna zmniejsza przewlekłe stany zapalne związane z otyłością i zmienia biomarkery, mikroflorę jelitową oraz długoterminową remisję cukrzycy typu 2. [78] Spadek poziomu leptyny w surowicy, który jest związany z chudym BMI, jest zwykle wynikiem operacji bariatrycznej. Co

ciekawe, kobietom, które miały wyższy przedoperacyjny poziom wyjściowy leptyny, łatwiej było utrzymać utratę masy ciała po zabiegu, podczas gdy te z niższym poziomem wyjściowym przed zabiegiem chirurgicznym łatwiej odzyskały wagę. Istnieje korelacja między wyjściowym poziomem leptyny a zmianami masy ciała, BMI, jak również całkowitą utratą masy ciała, chociaż stopnia powodzenia operacji nie można przewidzieć na podstawie poziomu leptyny w surowicy pacjenta. [79]

Transplantacja mikrobioty kałowej wzbudziła ostatnio duże zainteresowanie badaczy w leczeniu otyłości. Istnieją obiecujące przesłanki, że transplantacja drobnoustrojów pochodzących od zdrowych osób do pacjentów z otyłością może mieć wpływ na utratę i utrzymanie masy ciała. [80] W przełomowym badaniu przeszczepiono zawiesinę kału ludzkich bliźniąt z otyłością myszom wolnym od zarazków. Myszy z mikrobiomem osób otyłych pomyślnie rozwinęły otyłość, podczas gdy te z mikrobiomem zdrowych osobników pozostały szczupłe. Wyniki sekwencjonowania próbek kału myszy pobranych po zabiegu wykazały, że ludzkie mikrobiomy zostały z powodzeniem poddane infuzji, co wskazuje na przeniesienie funkcji związanych odpowiednio z otyłymi lub szczupłymi społecznościami drobnoustrojów. [81] Tak więc daje to nadzieje, że na wczesnym etapie, transplantacja mikrobioty kałowej może być opcją zastępującą otyłe społeczności drobnoustrojów co prowadzić będzie to zmniejszenia otyłości.

Z uwagi na to, że otyłość jest na tyle poważną chorobą i prowadzi ona do wielu niebezpiecznych następstw, a nadal nie mamy oczywistego leku na tą chorobę, postanowiłam zbadać, czy w populacji polskiej opisana w rozdziale 1.1.3. inwersja chromosomu 16 oraz geny leżące w jej obszarze predysponują do otyłości lub nadwagi.

2. Metodologia

2.1. Pochodzenie materiału.

W latach 2010- 2012 w związku z badaniem TESTOPLEK, skontaktowano się z 10 000 osobami z Polski. Badanie populacji zostało przeprowadzone przez firmę badawczą (SMG/KRC, Millward Brown, Warszawa, Polska). Zgodę na badanie wydała Komisja Rewizyjna Uniwersytetu Łódzkiego (KBBN-UL/II/2014). Zasady etyczne dotyczące badań medycznych z udziałem ludzi były zgodne z Deklaracją Helsińską [82]. Każdy badany otrzymał formularz zgody, kwestionariusz osobowy, informacje oraz zestaw do pobierania śliny zgodnie z zaleceniami producenta (Oragene DNA Collection kit OG-500 Tube Format, DNA Genotek, Ontario, Kanada). Ponad 10 000 probantów samodzielnie wypełniło kwestionariusz, podpisało formularz zgody, pobrało i zwróciło ślinę. Otrzymane paczki zostały sprawdzone pod kątem zawartości i kompletne próbki zostały zarejestrowane w kolekcji POPULOUS w Laboratorium Biobanku w Zakładzie Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego. Niepodpisane formularze zgody, brak kwestionariusza i/lub próbki bez śliny wykluczono z dalszej analizy. Łącznie zakodowano 6047 próbek i przechowywano je w temperaturze pokojowej. Osoby, które zadeklarowały, że są zdrowe, wybrano do grupy kontrolnej (n=5760).

2.2 Izolacja DNA.

Genomowy DNA ekstrahowano ze śliny za pomocą zestawu do oczyszczania DNA Puregene® (DNA Genotek, Ontario, Kanada) zgodnie z protokołem producenta. Sprawdzone jakość i ilość każdej wyizolowanej próbki DNA (przy użyciu zestawu Quant-iT-Broad-Range DNA Assay Kit; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Do sprawdzenia płci zastosowano zestaw amelogenina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Oba zestawy stosowano bez odchyień od protokołu producenta. Próbki DNA normalizowano do stężenia 50 ng/μl i przechowywano w temperaturze -30°C do dalszego użycia.

2.3. Genotypowanie

Przeprowadzono analizy genetyczne przy użyciu czipów DNA (Infinium Core-Exome 24 Beadchips, Illumina, Eindhoven, Holandia) oraz skanera mikromacierzy (iScan, Illumina

San Diego, Kalifornia, USA). Trzydniowy protokół przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta. W skrócie: DNA amplifikowano za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), a następnie inkubowano przez noc. Amplifikowany DNA fragmentowano za pomocą enzymów restrykcyjnych stosując krótką inkubację (1 godzina), wytrącono i ponownie zawieszono w dedykowanym buforze (bufor do elucji RA1). Próbki załadowano na chipy i inkubowano przez noc w celu hybrydyzacji. Próbki poddano enzymatycznemu wydłużaniu zasady i barwieniu fluorescencyjnemu. Chip został następnie załadowany do skanera chipów. Zeskanowane informacje zostały następnie automatycznie sprawdzone i przeanalizowane przez oprogramowanie (Genome Studio 2.0 z modułem genotypowania, Illumina, San Diego, Kalifornia, USA). Sprawdzenie jakości informacji przeprowadzono za pomocą kontroli wewnętrznych składających się z niezależnych od próbki oligonukleotydów w roztworze do hybrydyzacji. Wyniki jakości zostały przedstawione w „Raporcie podsumowującym kontrolę”. Zawartość eksonów składała się z około 240 000 markerów reprezentujących SNP’y występujące w różnych populacjach – w tym Europejczyków, Afrykanów i Chińczyków – oraz SNP’y, o których wiadomo, że są związane z szeregiem typowych chorób, takich jak cukrzyca typu 2, rak, zaburzenia metaboliczne i psychiatryczne oraz również markery lokalizacji chromosomów, w sumie dając około 500000 markerów SNP’ów. Proces ten powtarzano aż do uzyskania bazy danych zawierającej dane od około 5700 osób, w tym około 5600 osób zdrowych i 82 pacjentów z rakiem trzustki. Następnie bazę danych przekazano do Zakładu Biochemii Klinicznej i Molekularnej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, gdzie przeprowadzono badanie inwersyjne. W niniejszym badaniu wykorzystano dane pochodzące wyłącznie od osób zdrowych.

2.4. Część Bioinformatyczna.

2.4.1 Inwersja chromosomu 16.

Po uzyskaniu bazy danych, znaleziono miejsce występowania inwersji na podstawie artykułu „A Common 16p11.2 Inversion Underlies the Joint Susceptibility to Asthma and Obesity”. [13] Wzięto pod uwagę fragment w lokalizacji chromosomalnej przy 28,0 Mbp do 30,0 Mbp, który zawierał inwersję. Następnie stworzono plik z tym regionem za pomocą języka programowania PLINK:

```
CHR;POS_BEGIN;POS_END;GENE_NAME
```

16;28000000;30000000;CHR16_INV3

PLINK to narzędzie bioinformatyczne często wykorzystywane przez genetyków do badań rodowodowych i analizy danych genotypowych. Różne pliki wyjściowe zostały wygenerowane przez program PLINK w zależności od poleceń wejściowych. Pliki wejściowe dla PLINK to obecnie binarne pliki BIM, BED i FAM oraz za pomocą polecenia „--recode”, generowane są pliki PED i pliki MAP. Pliki PED zawierają dane dotyczące rodowodu i genotypu. Następnie stworzono program za pomocą języka programowania R i platformy statystycznej R do tworzenia plików PED i MAP.

R [83] to platforma statystyczna oparta na programowaniu z wiersza poleceń z własnym językiem programowania. To oprogramowanie ma ogromny wybór bibliotek kodowania do obliczania analiz statystycznych, w tym generowania grafiki. Jest to największa bezpłatna platforma statystyczna używana na całym świecie przez wielu badaczy, bez względu na używany system operacyjny (Linux, MacOs czy Windows). Ten program działał przy użyciu PLINK działającego w obrębie R:

```
"plink --bfile D:\\R\\PLINK\\lodz\\Panc_vs_controls_wo_XY
```

```
    --chr 16
```

```
    --from-bp 28000000 --to-bp 30000000
```

```
    --within D:\\R\\PLINK\\lodz\\phenotype_file_kombo.txt
```

```
    --recode --noweb
```

```
    --out
```

```
D:\\R\\PLINK\\lodz\\GENE_ANALYSIS\\CHR16_INV3\\CHR16\\CHR16_INV3\\CHR16_INV3"
```

Powyższy fragment kodu pokazuje kolejno: ścieżkę używaną przez program, nazwę chromosomu, dany region oraz miejsce, w którym zostaną zapisane dane. Plik MAP zawierał wszystkie SNP’y, które wystąpiły w regionie chromosomu od lokalizacji 28000000 do 30000000. Znalaziono 329 SNP’y. Następnie zredukowano region i wybrano tylko te SNP’y, które leżą dokładnie w miejscu inwersji, która została opisana w „ A Common 16p11.2 Inversion Underlies the Joint Susceptibility to Asthma and Obesity”. czyli od 28,39 Mbp do 28,50 Mbp również przy użyciu wspomnianego

programu wykorzystującego PLINK działającego w obrębie R. Ten region zawierał tylko SNP'y pomiędzy:

outside region / insideinside / outside

rs2726034 / rs149299 rs40837 / rs181206 dbSNP reference

28325561 / 28473820 28499524 / 28502082 location using GRCh38

28336882 / 28485141 28510845 / 28513403 location using GRCh37

To zawęziło liczbę SNP'ów do 17, które prawdopodobnie zawierają się w inwersji. Lista SNP'ów przedstawiona jest w Tabeli 1:

NR	RS_SNP	ILLU_SNP	BP_POS
1	rs149299	rs149299	28485141
2	rs151179	kgp9229696	28487056
3	rs77595156	exm1229459	28488943
4	rs151181	exm-rs151181	28490517
5	rs201407601	exm1229471	28493455
6	rs144770450	exm1229500	28498845
7	rs11552531	exm1229505	28499044
8	rs137906617	exm1229510	28499964
9	rs201225986	exm1229512	28500611
10	rs200346089	exm1229541	28507029
11	rs151136790	exm1229550	28507245
12	rs200832612	exm1229590	28507855
13	rs112010846	exm1229621	28508320
14	rs61753940	exm1229626	28508413
15	rs201730712	exm1229635	28508491
16	rs200890256	exm1229681	28509564
17	rs40837	rs40837	28510845

Tabela 1. Lista SNP'ów wybranych do analizy dla inwersji chromosomu 16.

Cała lista wszystkich zdrowych osobników musiała zostać przekształcona w format umożliwiający wyrównanie wszystkich SNP'ów. Utworzono tabelę, która zawierała tylko genotypy 17 SNP'ów bez żadnych innych danych. Następnie utworzono plik formatu FASTA, który mógł być wykorzystany w programie R. Poniżej znajduje się kod, który tworzy format pliku FASTA przy użyciu R:

```
PHENO_ALLELE<-read.csv(choose.files(), sep=",")
```



```

TABLE_1<-matrix(nrow = nrow(PHENO_ALLELE), ncol= (ncol(PHENO_ALLELE)-
10))

for(n in 1:ncol(TABLE_1)){

  TABLE_1[,n]<-as.character(PHENO_ALLELE[(n+10)])

}

rownames(TABLE_1)<-PHENO_ALLELE[,2]

sink("D:\\R\\PLINK\\lodz\\GENE_ANALYSIS\\KAM_16\\KAM_16_SEQ.txt")

for(q in 1:nrow(TABLE_1)){

  cat(">",rownames(TABLE_1)[q],sep = "", "\n")

  cat(paste(TABLE_1[q,], collapse=""),"\n")

}

sink()

```

Po uzyskaniu pliku, umieszczono go w internetowym programie o nazwie MAFFT wersja 7 [84] . Dopasowanie wielu sekwencji (MSA) jest ważnym krokiem w porównawczych analizach sekwencji biologicznych, a program MAFFT oferuje tę usługę online. Ma kilka różnych opcji obliczania dużych dopasowań wielu sekwencji składających się z tysięcy sekwencji. [85]

Tutaj, zamiast dopasowywania rzeczywistych sekwencji DNA, użyto tego do wyrównania kolejnych wartości SNP [86]. Po przesłaniu pliku wybrano strategię G-Large-INS-1, która dotyczy sekwencji mniejszych niż 10000 bp. i normalny tryb użycia pamięci. W ustawieniach parametrów zaznaczono 1PAM/k=2, ponieważ analiza została wykonana na DNA. Cały plik gdzie wykonane zostało dopasowanie znajduje się w Danych Uzupełniających na płycie CD. Na rycinie 2. przedstawiono grafikę przedstawiającą stronę, na której znajduje się ten program.

Download version
Mac OS X
Windows
Linux
Source
Online version
Alignment
mafft --add
Mafft
PhyloSnp
Ragout tree
Mafft - limitations
Algorithms
FAQ
Benchmarks
Feedback

Submit | Reset

Advanced settings

Strategy
Progressive methods with chained guide trees: [Help](#)
 Pileup
 Random chain

Tree-based progressive methods: [Help](#)
 PartTree
 DPPartTree (for sequences shorter than 10,000 sites)
 FFT-NS-1 (for less than 100,000 sequences)
 FFT-NS-2 (for less than 100,000 sequences: ~2 times slower but more accurate than FFT-NS-1)
 C-large-INS-1 (for less than 10,000 sequences shorter than 5,000 sites; MPI)
 C-large-INS-1 (for less than 100,000 sequences shorter than 5,000 sites; MPI)
 L-large-INS-1 (for less than 10,000 sequences shorter than 5,000 sites)
 L-large-INS-1 (for less than 100,000 sequences shorter than 5,000 sites; MPI)

Partially iterative refinement methods (for less than 100,000 sequences): [Help](#)
 mafft-sparsecore (p=100)
 mafft-sparsecore (p=500)
 mafft-sparsecore (p=1000)

Memory usage (effective for FFT-NS-1, FFT-NS-2 and mafft-sparsecore): [Help](#)
 Normal mode
 Low-memory mode (accepts more than 100,000 sequences but slower and slightly less accurate than default)

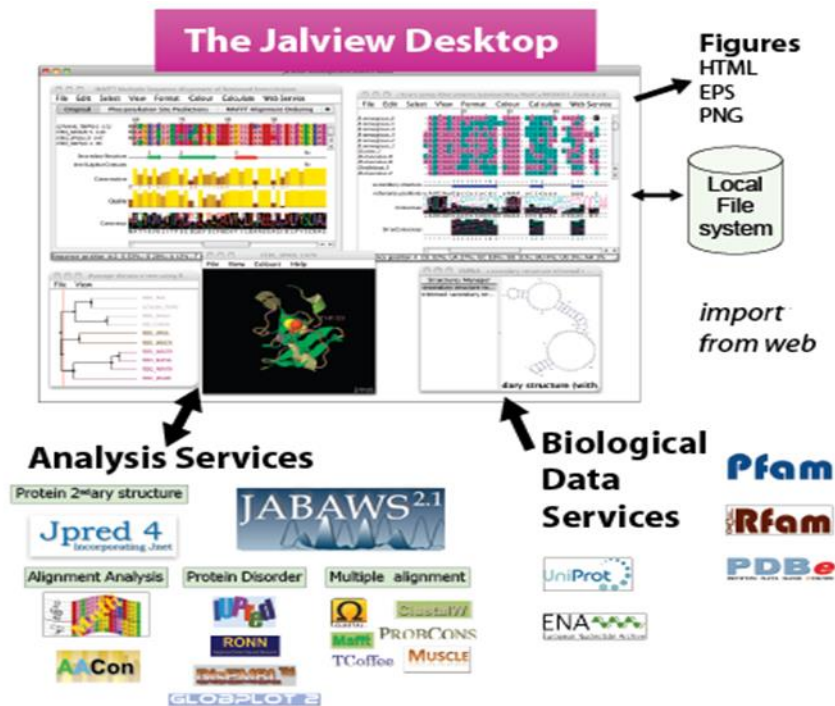
Parameters
Scoring matrix for amino acid sequences:
Scoring matrix for nucleotide sequences:
! Switch it to '1PAM / k=2' when aligning closely related DNA sequences.
Gap opening penalty: (1.0 - 5.0)
Offset value: (0.0 - 1.0)

Score of it in nucleotide data: [Example](#)
! Long stretches of Ns tend to be gapped (excluded from the alignment).
 (inzero) N has no effect on the alignment score.
 (inwildcard) N is treated like a wildcard. [Experimental option](#) (2016/Apr/26)

Rycina 2. Przykładowe okno programu MAFFT.

Źródło : <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/large.html?17jul>

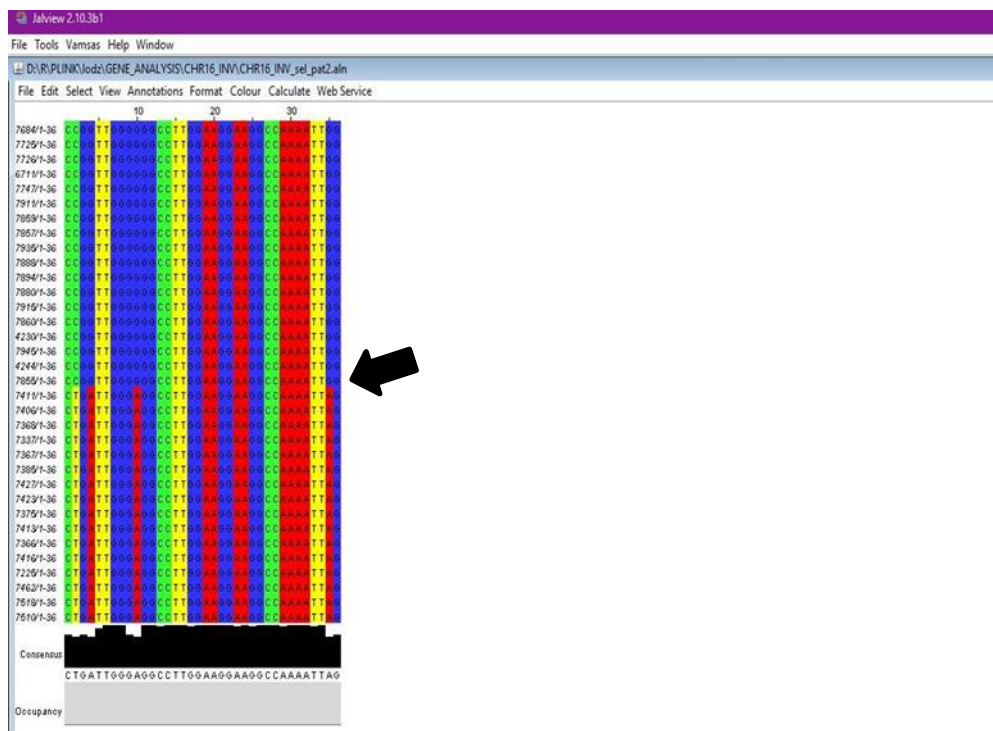
Po zakończeniu analizy programu otworzono utworzone dopasowanie w formacie CLUSTAL w przeglądarce dopasowania wielu sekwencji (program Jalview Desktop [87]). Program Jalview jest narzędziem do tworzenia statycznej wizualizacji z narzędziami do edycji, kolorowania i generowania liczb [88]. Rycina 3. przedstawia przykładowy obraz programu online.



Rycina 3. Przykładowy obraz programu JalView.

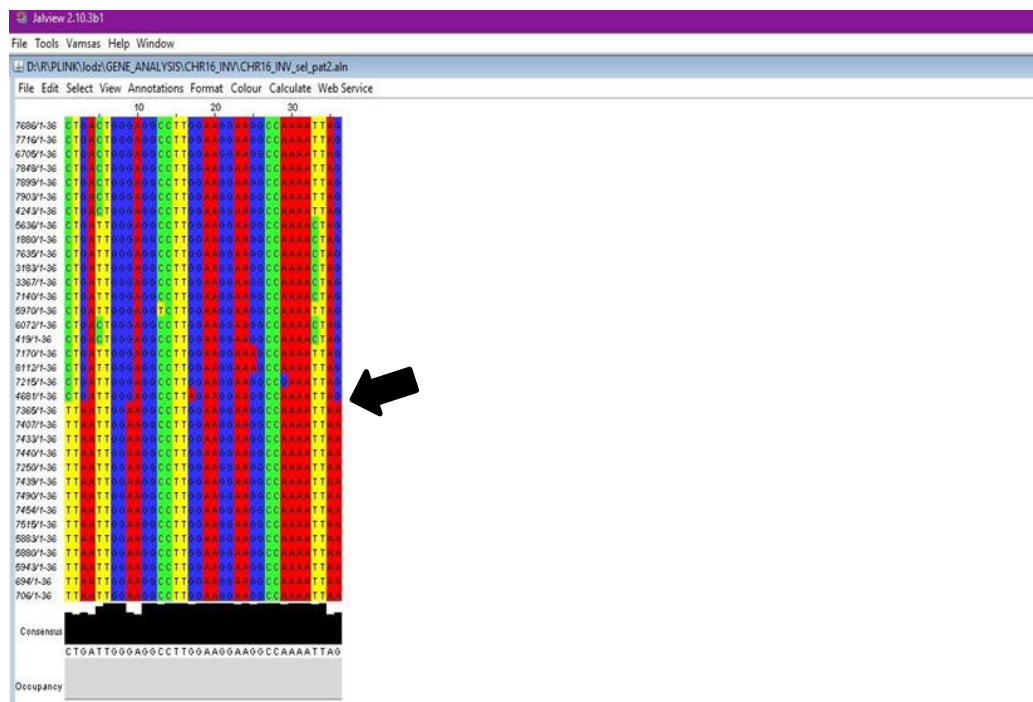
Źródło: <http://www.jalview.org/>

W Jalview Desktop załadowano otrzymany plik z programu MAFFT, a następnie dodano kolory do poszczególnych nukleotydów, aby można było zidentyfikować SNP'y, które utworzyły nierekombinowane grupy (prawdopodobnie oznaczając inwersję). Wyniki przedstawiają ryciny poniżej. W Danych Uzupełniających umieszczono również plik obrazujący dopasowanie sekwencji.



Rycina 4. Wyniki dopasowania SNP'ów od wszystkich badanych. Pokazano tylko część pokazując przejście między homozygotami typu 1 a heterozygotami.

Źródło : Praca Magisterska autorstwa Kamili Rydzewskiej „ A genetic sequence inversion on chromosome 16 in the Polish population”



Rycina 5. Wyniki dopasowania SNP'ów od wszystkich badanych. Pokazano tylko część pokazującą przejście między heterozygotami, a homozygotami typu 2.

Źródło : Praca Magisterska autorstwa Kamili Rydzewskiej „A genetic sequence inversion on chromosome 16 in the Polish population”

Na rycinach widać, jak genotypy pacjentów zmieniają się z homozygoty w heterozygotę i ponownie w homozygotę, wskazując na inwersję. Zidentyfikowano cztery SNP'y, które razem wskazują na inwersję poprzez wspólne przechodzenie od homozygoty do heterozygoty do homozygoty. Są to kolejno :

1. rs149299
2. rs151179
3. rs151181
4. rs40837

Jednakże wyniki uzyskane w programie MAFT wyraźnie pokazały, że analiza została zniekształcona przez pacjentów, których nie można było przypisać do jednej z trzech grup. Zostali wykluczeni, ponieważ osoby te wykazywały heterozygotyczny wariant w SNP rs40837, podczas gdy inne SNP'y wykazywały homozygoty typu 2. SNP rs40837 leży blisko regionu duplikacji oraz delecji [89], co daje możliwy powód, dla którego wartości genotypu mogą różnić się od pozostałych trzech SNP'ów, które są znacznie dalej od tego obszaru. Z uwagi na to do dalszej analizy jako markery inwersji wybrano tylko 3 SNP'y:

rs149299, rs151179 i rs151181. Wszystkie powyższe wyniki są szczegółowo opisane w Pracy Magisterskiej „A genetic sequence inversion on chromosome 16 in the Polish population.” autorstwa Kamili Rydzewskiej. Baza zawierająca informacje o 17 SNP’ach została użyta do analizy statystycznej oraz dodatkowo została umieszczona w Danych Uzupełniających znajdujących się na płycie CD.

2.4.2 Gen TUFM.

Po uzyskaniu bazy danych, znaleziono miejsce występowania genu TUFM na podstawie artykułu „A Common 16p11.2 Inversion Underlies the Joint Susceptibility to Asthma and Obesity”. [13] Wzięto pod uwagę fragment w lokalizacji chromosomalnej przy 28.853.732 Mbp do 28.857.729 Mbp, w którym leży dany gen. Następnie stworzono plik z tym regionem za pomocą języka programowania PLINK:

```
CHR;POS_BEGIN;POS_END;GENE_NAME
```

```
16:28,853,732-28,857,729;RESULTS_TUFM
```

Następnie stworzono program za pomocą języka programowania R i platformy statystycznej R do tworzenia plików PED i MAP.

Ten program działał przy użyciu PLINK działającego w obrębie R:

```
"plink --bfile D:\\R\\PLINK\\lodz\\Panc_vs_controls_wo_XY
```

```
  --chr 16
```

```
  --from-bp 28853732 --to-bp 28857729
```

```
  --within D:\\R\\PLINK\\lodz\\phenotype_file_kombo.txt
```

```
  --recode --noweb
```

```
  --out D:\\R\\PLINK\\lodz\\GENE_ANALYSIS\\RESULTS_TUFM"
```

Powyższy fragment kodu pokazuje kolejno: ścieżkę używaną przez program, nazwę chromosomu, dany region oraz miejsce, w którym zostaną zapisane dane. Plik MAP zawierał wszystkie SNP’y, które wystąpiły w regionie chromosomu od lokalizacji 28853732 do 28857729. Znaleziono 6 SNP’ów. Lista SNP’ów przedstawiona jest w Tabeli 2:

RS_SNP	ILLU_SNP	CHR	BP_POS
rs146326033	exm1230225	16	28854372
rs143189885	exm1230253	16	28856081
rs201756974	exm1230259	16	28856321
rs8061877	rs8061877	16	28856819
rs150844967	exm1230269	16	28857363
rs116562140	exm1230274	16	28857416

Tabela 2. Lista SNP'ów wybranych do analizy dla genu TUFM.

Cała lista wszystkich zdrowych osobników musiała zostać przekształcona w format umożliwiający wyrównanie wszystkich SNP'ów. Tak przygotowana baza została użyta do analizy statystycznej oraz dodatkowo została umieszczona w Danych Uzupełniających znajdujących się na płycie CD.

2.4.3 Gen SH2B1.

Po uzyskaniu bazy danych, znaleziono miejsce występowania genu SH2B1 na podstawie artykułu „ A Common 16p11.2 Inversion Underlies the Joint Susceptibility to Asthma and Obesity”. [13] Wzięto pod uwagę fragment w lokalizacji chromosomalnej przy 28.857.921 Mbp do 28.885.534 Mbp, w którym leży dany gen. Następnie stworzono plik z tym regionem za pomocą języka programowania PLINK:

CHR;POS_BEGIN;POS_END;GENE_NAME

16:28,857,921-28,885,534:RESULTS_SH2B1

Następnie stworzono program za pomocą języka programowania R i platformy statystycznej R do tworzenia plików PED i MAP.

Ten program działał przy użyciu PLINK działającego w obrębie R:

```
"plink --bfile D:\\R\\PLINK\\lodz\\Panc_vs_controls_wo_XY
```

```
  --chr 16
```

```
  --from-bp 28857921 --to-bp 28885534
```

```
  --within D:\\R\\PLINK\\lodz\\phenotype_file_kombo.txt
```

```
  --recode --noweb
```

```
  --out D:\\R\\PLINK\\lodz\\GENE_ANALYSIS\\RESULTS_SH2B1"
```

Powyższy fragment kodu pokazuje kolejno: ścieżkę używaną przez program, nazwę chromosomu, dany region oraz miejsce, w którym zostaną zapisane dane. Plik MAP zawierał wszystkie SNP'y, które wystąpiły w regionie chromosomu od lokalizacji 28857921 do 28885534. Znalaziono 8 SNP'ów. Lista SNP'ów przedstawiona jest w Tabeli 3:

RS_SNP	ILLU_SNP	CHR	BP_POS
rs149091795	exm1230289	16	28877684
rs144126859	exm1230290	16	28877711
rs141195883	exm1230297	16	28877864
rs147094247	exm1230300	16	28877939
rs199996405	exm1230314	16	28878202
rs142515048	exm1230356	16	28883975
rs143410496	exm1230357	16	28883993
rs190981290	exm1230366	16	28884858

Tabela 3. Lista SNP'ów wybranych do analizy dla genu SH2B1.

Cała lista wszystkich zdrowych osobników musiała zostać przekształcona w format umożliwiający wyrównanie wszystkich SNP'ów. Tak przygotowana baza została użyta do analizy statystycznej oraz dodatkowo została umieszczona w Danych Uzupełniających znajdujących się na płycie CD.

2.4.4 Gen CCDC101.

Po uzyskaniu bazy danych, znaleziono miejsce występowania genu CCDC101 na podstawie artykułu „A Common 16p11.2 Inversion Underlies the Joint Susceptibility to Asthma and Obesity”. [13] Wzięto pod uwagę fragment w lokalizacji chromosomalnej przy 28.565.236 Mbp do 28.603.111 Mbp, w którym leży dany gen. Następnie stworzono plik z tym regionem za pomocą języka programowania PLINK:

```
CHR;POS_BEGIN;POS_END;GENE_NAME
```

```
16:28,565,236-28,603,111:RESULTS_CCDC101
```

Następnie stworzono program za pomocą języka programowania R i platformy statystycznej R do tworzenia plików PED i MAP.

Ten program działał przy użyciu PLINK działającego w obrębie R:

```
"plink --bfile D:\\R\\PLINK\\lodz\\Panc_vs_controls_wo_XY
```



```

--chr 16

--from-bp 28565236 --to-bp 28603111

--within D:\\R\\PLINK\\lodz\\phenotype_file_kombo.txt

--recode --noweb

--out D:\\R\\PLINK\\lodz\\GENE_ANALYSIS\\RESULTS_CCDC101"

```

Powyższy fragment kodu pokazuje kolejno: ścieżkę używaną przez program, nazwę chromosomu, dany region oraz miejsce, w którym zostaną zapisane dane. Plik MAP zawierał wszystkie SNP'y, które wystąpiły w regionie chromosomu od lokalizacji 28565236 do 28603111. Znalaziono 4 SNP'y. Lista SNP'ów przedstawiona jest w Tabeli 4:

RS_SNP	ILLU_SNP	CHR	BP_POS
rs146510287	exm1229748	16	28592459
rs4788073	rs4788073	16	28594549
variant40184	variant40184	16	28600428
rs11401	rs11401	16	28602991

Tabela 4. Lista SNP'ów wybranych do analizy dla genu CCDC101.

Cała lista wszystkich zdrowych osobników musiała zostać przekształcona w format umożliwiający wyrównanie wszystkich SNP'ów. Tak przygotowana baza została użyta do analizy statystycznej oraz dodatkowo została umieszczona w Danych Uzupełniających znajdujących się na płycie CD.

2.4.5 Gen APOB48R.

Po uzyskaniu bazy danych, znaleziono miejsce występowania genu APOB48R na podstawie artykułu „A Common 16p11.2 Inversion Underlies the Joint Susceptibility to Asthma and Obesity”. [13] Wzięto pod uwagę fragment w lokalizacji chromosomalnej przy 28.505.970 Mbp do 28.510.291 Mbp, w którym leży dany gen. Następnie stworzono plik z tym regionem za pomocą języka programowania PLINK:

```
CHR;POS_BEGIN;POS_END;GENE_NAME
```

```
16:28,505,970-28,510,291:RESULTS_APOB48R
```

Następnie stworzono program za pomocą języka programowania R i platformy statystycznej R do tworzenia plików PED i MAP.

Ten program działał przy użyciu PLINK działającego w obrębie R:

```
"plink --bfile D:\\R\\PLINK\\lodz\\Panc_vs_controls_wo_XY  
  
--chr 16  
  
--from-bp 28505970 --to-bp 28510291  
  
--within D:\\R\\PLINK\\lodz\\phenotype_file_kombo.txt  
  
--recode --noweb  
  
--out D:\\R\\PLINK\\lodz\\GENE_ANALYSIS\\RESULTS_APOB48R"
```

Powyższy fragment kodu pokazuje kolejno: ścieżkę używaną przez program, nazwę chromosomu, dany region oraz miejsce, w którym zostaną zapisane dane. Plik MAP zawierał wszystkie SNP'y, które wystąpiły w regionie chromosomu od lokalizacji 28505970 do 28510291. Znalaziono 23 SNP'y. Lista SNP'ów przedstawiona jest w Tabeli 5:

RS_SNP	ILLU_SNP	CHR	BP_POS
rs28576169	exm1229533	16	28506882
rs200346089	exm1229541	16	28507029
rs140393803	exm1229548	16	28507179
rs142080760	exm1229549	16	28507185
rs151136790	exm1229550	16	28507245
rs73533478	exm1229551	16	28507258
rs61738751	exm1229584	16	28507695
rs199677239	exm1229588	16	28507806
rs200832612	exm1229590	16	28507855
rs201825043	exm2252537	16	28508006
exm1229606	exm1229606	16	28508107
rs112010846	exm1229621	16	28508320
rs61753940	exm1229626	16	28508413
rs201730712	exm1229635	16	28508491
rs200288763	exm1229636	16	28508506
rs201232528	exm1229640	16	28508577
rs40832	exm1229648	16	28508716
rs113343275	exm1229649	16	28508782
rs199840321	exm1229654	16	28508916
rs201246198	exm1229669	16	28509238
rs199615243	exm1229672	16	28509414
rs200890256	exm1229681	16	28509564
rs201894432	exm1229687	16	28509768

Tabela 5. Lista SNP'ów wybranych do analizy dla genu APOB48R.

Cała lista wszystkich zdrowych osobników musiała zostać przekształcona w format umożliwiający wyrównanie wszystkich SNP'ów. Tak przygotowana baza została użyta do analizy statystycznej oraz dodatkowo została umieszczona w Danych Uzupełniających znajdujących się na płycie CD.

2.4.6 Gen SPNS1.

Po uzyskaniu bazy danych, znaleziono miejsce występowania genu SPNS1 na podstawie artykułu „A Common 16p11.2 Inversion Underlies the Joint Susceptibility to Asthma and Obesity”. [13] Wzięto pod uwagę fragment w lokalizacji chromosomalnej przy 28.985.542 Mbp do 28.995.869 Mbp, w którym leży dany gen. Następnie stworzono plik z tym regionem za pomocą języka programowania PLINK:

CHR;POS_BEGIN;POS_END;GENE_NAME

16:28,985,542-28,995,869:RESULTS_SPNS1

Następnie stworzono program za pomocą języka programowania R i platformy statystycznej R do tworzenia plików PED i MAP.

Ten program działał przy użyciu PLINK działającego w obrębie R:

```
"plink --bfile D:\\R\\PLINK\\lodz\\Panc_vs_controls_wo_XY  
  
--chr 16  
  
--from-bp 28985542 --to-bp 285995869  
  
--within D:\\R\\PLINK\\lodz\\phenotype_file_kombo.txt  
  
--recode --noweb  
  
--out D:\\R\\PLINK\\lodz\\GENE_ANALYSIS\\RESULTS_SPNS1"
```

Powyższy fragment kodu pokazuje kolejno: ścieżkę używaną przez program, nazwę chromosomu, dany region oraz miejsce, w którym zostaną zapisane dane. Plik MAP zawierał wszystkie SNP'y, które wystąpiły w regionie chromosomu od lokalizacji 28985542 do 28995869. Znalaziono 10 SNP'ów. Lista SNP'ów przedstawiona jest w Tabeli 6:

RS_SNP	ILLU_SNP	CHR	BP_POS
rs8045689	rs8045689	16	28988269
rs150373976	exm1230744	16	28990587
rs137908704	exm1230745	16	28990588
rs3922668	rs3922668	16	28992646
rs201586251	exm1230753	16	28992903
rs11859822	exm2272432	16	28995057
rs201680708	exm1230797	16	28995189
rs199695694	exm1230809	16	28995582
rs149610167	exm1230810	16	28995583
rs7140	exm2273534	16	28995757

Tabela 6. Lista SNP'ów wybranych do analizy dla genu SPNS1.

Cała lista wszystkich zdrowych osobników musiała zostać przekształcona w format umożliwiający wyrównanie wszystkich SNP'ów. Tak przygotowana baza została użyta do analizy statystycznej oraz dodatkowo została umieszczona w Danych Uzupełniających znajdujących się na płycie CD.

2.4.7 Gen SULT1A4.

Po uzyskaniu bazy danych, znaleziono miejsce występowania genu SULT1A4 na podstawie artykułu „A Common 16p11.2 Inversion Underlies the Joint Susceptibility to Asthma and Obesity”. [13] Wzięto pod uwagę fragment w lokalizacji chromosomalnej przy 29.467.127 Mbp do 29.476.301 Mbp, w którym leży dany gen. Następnie stworzono plik z tym regionem za pomocą języka programowania PLINK:

```
CHR;POS_BEGIN;POS_END;GENE_NAME
```

```
16:29,467,127-29,476,301:RESULTS_SULT1A4
```

Następnie stworzono program za pomocą języka programowania R i platformy statystycznej R do tworzenia plików PED i MAP.

Ten program działał przy użyciu PLINK działającego w obrębie R:

```
"plink --bfile D:\\R\\PLINK\\lodz\\Panc_vs_controls_wo_XY  
    --chr 16  
    --from-bp 29467127 --to-bp 29476301  
    --within D:\\R\\PLINK\\lodz\\phenotype_file_kombo.txt  
    --recode --noweb  
    --out D:\\R\\PLINK\\lodz\\GENE_ANALYSIS\\RESULTS_SULT1A4"
```

Powyższy fragment kodu pokazuje kolejno: ścieżkę używaną przez program, nazwę chromosomu, dany region oraz miejsce, w którym zostaną zapisane dane. Plik MAP zawierał wszystkie SNP'y, które wystąpiły w regionie chromosomu od lokalizacji 29467127 do 29476301. Znaleziono 11 SNP'ów. Lista SNP'ów przedstawiona jest w Tabeli 7:

RS_SNP	ILLU_SNP	CHR	BP_POS
rs1042157	GA031269	16	28617057
rs41278160	kgp16426026	16	28617507
rs1042014	rs1042014	16	28618318
rs200013410	exm1229928	16	28618332
rs115253552	kgp16461928	16	28619866
rs114062355	kgp16488336	16	28620354
rs35480621	kgp16473159	16	28621318
rs79527462	exm1229980	16	28631383
indel40191	indel40191	16	28631439
rs1968752	kgp7158781	16	28631585
kgp5388595	kgp5388595	16	28632021

Tabela 7. Lista SNP'ów wybranych do analizy dla genu SULT1A4.

Cała lista wszystkich zdrowych osobników musiała zostać przekształcona w format umożliwiający wyrównanie wszystkich SNP'ów. Tak przygotowana baza została użyta do analizy statystycznej oraz dodatkowo została umieszczona w Danych Uzupełniających znajdujących się na płycie CD.

2.5. Statystyka.

Analiza statystyczna została wykonana na bazie danych zawierających 4722 badanych, ponieważ osoby, którym brakowało danych zostały usunięte. Baza danych zawierała następujące informacje : Płeć (2 – Mężczyźni, 1- Kobiety), Rok urodzenia, Wiek, Liczbę dzieci, Wartość BMI (Kg/m²). Na podstawie wyliczonych wartości BMI oraz klasyfikacji [90] ,badanych przydzielono do 4 grup:

1. Niedowaga - wartość BMI poniżej 18.5
2. Waga normalna/prawidłowa – wartość BMI 18.5-24.9
3. Nadwaga – wartość BMI 25.0 – 29.9
4. Otyłość – wartość BMI większe lub równe 30.0

Aby obliczyć istotność statystyczną pomiędzy wiekiem, a wartością liczbową BMI użyto korelacji rho-Spearmana. Podobnie jak wszystkie współczynniki korelacji, rho - Spearmana mierzy siłę związku między dwiema zmiennymi. W związku z tym współczynnik korelacji Spearmana jest podobny do współczynnika korelacji Pearsona. Wszystkie analizy korelacji dwuwymiarowych wyrażają siłę związku między dwiema zmiennymi w pojedynczej wartości z zakresu od -1 do +1. Ta wartość jest nazywana współczynnikiem korelacji . Dodatni współczynnik korelacji wskazuje na dodatnią

zależność między dwiema zmiennymi (gdy wartości jednej zmiennej rosną, wartości drugiej zmiennej również rosną), podczas gdy ujemny współczynnik korelacji wyraża ujemną zależność (gdy wartości jednej zmiennej rosną, wartości drugiej zmiennej zmniejszają). Współczynnik korelacji równy zero wskazuje, że nie istnieje związek między zmiennymi [91]. Analiza regresji liniowej służy do przewidywania wartości zmiennej na podstawie wartości innej zmiennej. Ta forma analizy szacuje współczynniki równania liniowego, obejmującego jedną lub więcej zmiennych niezależnych, które najlepiej przewidują wartość zmiennej zależnej. Regresja liniowa dopasowuje linię prostą lub powierzchnię, która minimalizuje rozbieżności między przewidywanymi a rzeczywistymi wartościami wyjściowymi. [92] Ponieważ założenie regresji liniowej było mało prawdopodobne, regresja liniowa nie została wykorzystana do obliczenia istotności statystycznej, ale została wykorzystana jedynie w celu nadania wykresom przybliżonych linii trendu.

Aby obliczyć istotność statystyczną pomiędzy płcią, a wartościami liczbowymi BMI użyto regresji logistycznej. Ten typ modelu statystycznego (znany również jako model logitowy) jest często używany do klasyfikacji i analiz predykcyjnych. Ponieważ wynik jest prawdopodobieństwem, zmienna zależna jest ograniczona od 0 do 1. Po znalezieniu optymalnego współczynnika, prawdopodobieństwa warunkowe dla każdej obserwacji można obliczyć, zarejestrować i zsumować, aby uzyskać przewidywane prawdopodobieństwo. W przypadku klasyfikacji binarnej prawdopodobieństwo mniejsze niż 0,5 przewiduje 0, podczas gdy prawdopodobieństwo większe niż 0 przewiduje 1 [93].

Aby obliczyć istotność statystyczną pomiędzy liczbą dzieci, a wartościami liczbowymi BMI użyto testu Kruskala-Wallisa. Test ten, jest opartym na rangach nieparametrycznym testem, którego można użyć do określenia, czy istnieją statystycznie istotne różnice między dwiema lub więcej grupami zmiennej niezależnej, a ciągła lub porządkowa zmienna zależna [94].

Aby obliczyć istotność statystyczną pomiędzy obszarem inwersji genetycznej na chromosomie 16, a BMI użyto pakietu R o nazwie „SNPassoc”. Pakiet „SNPassoc” zawiera narzędzia do manipulacji danymi, eksploracyjną analizę danych z grafiką oraz ocenę powiązań genetycznych zarówno dla cech ilościowych, jak i binarnych [95]. Zmienne kodujące genotypy SNP definiuje się funkcją `snp`, która zajmuje się formatowaniem i przypisuje klasę 'snp'. Podsumowanie obiektu „snp” pokazuje częstości

genotypów i alleli, brakujące wartości, adnotację na temat monomorficzności oraz test zgodności z równowagą Hardy'ego-Weinberga. Domyślnie kategorią referencyjną jest genotyp homozygotyczny dla najczęstszego allelu. Następnie wykorzystano funkcję „*WGassociation*” dostępną w pakiecie SNPassoc. Funkcja ta pozwala nam wykonać analizę powiązań dla każdego SNP zarówno dla ilościowych, jak i binarnych zmiennych. W przypadku odpowiedzi binarnych analizę regresji logistycznej podsumowuje się za pomocą częstości genotypów, proporcji, ilorazów szans (OR) i 95% przedziałów ufności (CI). W przypadku odpowiedzi ilościowych regresję liniową podsumowuje się za pomocą średnich, błędów standardowych, średnich różnic w odniesieniu do kategorii referencyjnej i 95% przedziału ufności różnic. [96] [97] Regresja wykonywana jest dla 4 modeli: model dominujący, model recesywny, model przewagi heterozygoty i model addytywny. Analizę przeprowadzono zarówno pomiędzy wszystkimi czterema grupami BMI, jak i kolejno pomiędzy grupą z wagą prawidłową i otyłością, grupą z wagą prawidłową i niedowagą, grupą z niedowagą i otyłością oraz grupą z wagą prawidłową i nadwagą.

Przeprowadzono również regresję logistyczną oraz liniową dla modelu dominującego i recesywnego oraz test Fishera i test Cochran'a również dla tych modeli. Test Fishera służy do określenia, czy istnieje istotny związek między dwiema zmiennymi kategorialnymi. Zwykle jest używany jako alternatywa dla testu niezależności chi-kwadrat, gdy jedna lub więcej komórek w tabeli 2×2 jest mniejsza niż 5. [98] Test Cochrana jest testem nieparametrycznym do analizy losowych układów kompletnych bloków, w których zmienna odpowiedzi jest zmienną binarną (tj. są tylko dwa możliwe wyniki, które są zakodowane jako 0 i 1). [99] W przypadku tych testów 1 oznaczono homozygotę występującą częściej oraz heterozygotę, a 0 homozygotę występującą rzadziej u badanych.

Analizy z Tabel : 11, 14, 18, 21, 25, 27, 28, 32, 35, 38, 39, 42, 45, 49 zostały dostosowane do płci oraz wieku. Jest to istotne, ponieważ na podstawie badań na tej samej bazie danych, wykazano, że wiek wpływa na wartości BMI. [100] Również podczas wykonywania charakterystyki grupy badanej w tej analizie, wykazano, że wiek wpływa na wartości BMI i wraz z wiekiem, wartości te rosną oraz, że istnieje istotna statystycznie różnica pomiędzy grupą kobiet, a mężczyzn, gdzie mężczyźni mają wyższe wartości BMI. Biorąc to pod uwagę, analiza musiała zostać wykonana z dostosowaniem do tych dwóch parametrów.

3. Wyniki

3.1 Charakterystyka grupy badanej.

Tabela 8. Przedstawia charakterystykę grupy badanej liczącej 4722 osób.

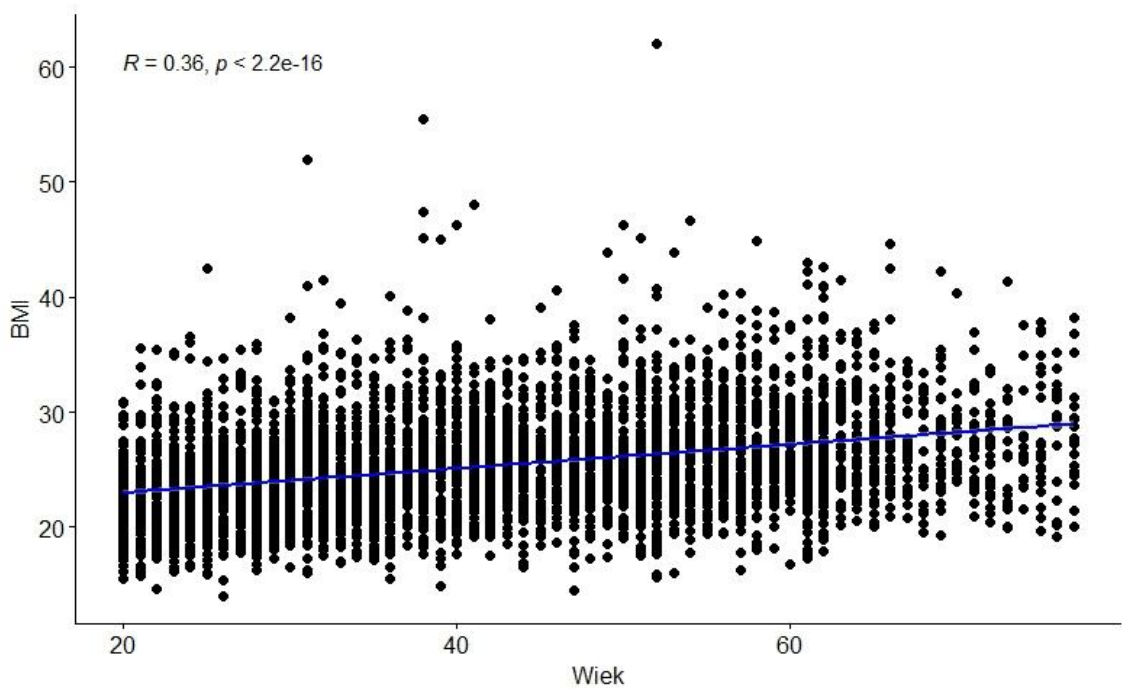
Zmienna	Wynik	Test Zmienna : BMI		
		Typ Testu	Test Statystyczny	P
Wiek (Średnia, SD)	42.4±14.7	Korelacja Spearmana	Rho=0.36	2.41x10 ⁻¹⁴⁶
		Regresja Liniowa	t= 24.48	<2x10 ⁻¹⁶
Płeć (Kobiety, Mężczyźni)	2277/2445	Regresja Logistyczna	z=9.475	<2x10 ⁻¹⁶
BMI (Średnia, SD)	25.3±4.5	-		
Grupa BMI (n)	175/2272/1584/691	-		
Liczba dzieci (n)	1459/863/1370/1030			
(Średnia BMI, SD)	23.39±4.12/25.08±4.36/26.51±4.79	Kruskall-Wallis	H=307.72	5.83x10 ⁻⁵⁶

BMI = body mass index in Kg/m²

Tabela 8. Charakterystyka całej grupy badanej (N=4722) .

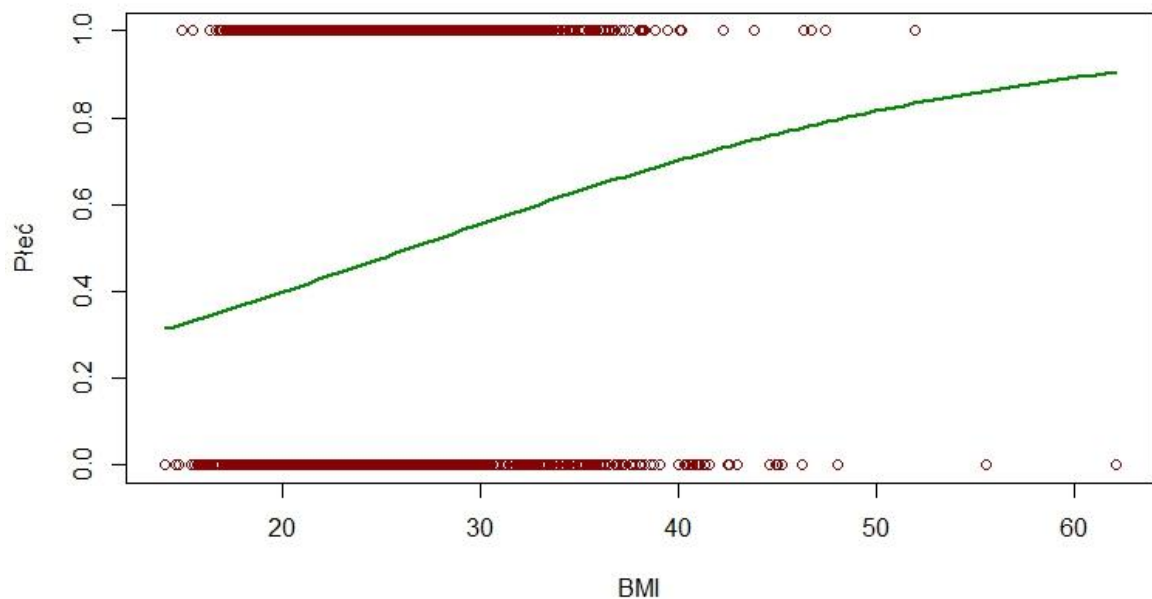
Średnia wartość BMI w grupie badanej wynosiła 25.3 przy odchyleniu standardowym 4.5. W grupie badanej 175 osób miało niedowagę (1), 2272 wagę prawidłową (2), 1584 osób miało nadwagę (3), a 691 miało otyłość (4).

W grupie badanej średnia wieku wynosiła 42.4 lata przy odchyleniu standardowym 14.7. Po wykonaniu regresji liniowej oraz korelacji Spearmana, pomiędzy wiekiem, a numeryczną wartością BMI wykazano istotną różnicę statystyczną (p.value < 0.05) pomiędzy tymi dwoma zmiennymi, zatem możemy wyciągnąć wniosek, że zarówno wiek lub rok urodzenia wpływają na wartości BMI. Wartość rho dla wyniku korelacji jest dodatnia, zatem wiek rośnie wraz ze wzrostem wartości BMI. Analiza pomiędzy wiekiem, a BMI została wykonana na grupie badanej liczącej 4687, ponieważ usunięto osoby, które nie miały podanego wieku.



Rycina 6. Korelacja Spearmana pomiędzy wiekiem, a BMI w grupie wszystkich badanych. (Linia trendu regresji liniowej jest pokazana tylko dla ilustracji) N=4687.

W grupie badanej 2277 osób to kobiety, a 2445 osób to mężczyźni. Po wykonaniu regresji logistycznej pomiędzy płcią, a wartością numeryczną BMI wykazano istotną różnicę statystyczną ($p.value < 0.05$) pomiędzy dwoma płciami a zatem płeć wpływa na wartości BMI. Poniższa rycina przedstawia graficzny zapis regresji logistycznej, gdzie 1 odpowiada płci żeńskiej, a 0 płci męskiej. Możemy zaobserwować wzrost w kierunku płci żeńskiej, zatem kobiety w badanej grupie mają wyższe BMI niż mężczyźni (Średnie wartości obydwu grup podane są w Tabeli 9 i Tabeli 10).



Rycin 7. Regresja logistyczna pomiędzy płcią, a BMI.

W grupie badanej 1459 osób nie miało dzieci (0). Średnia wartości BMI tej grupy wynosiła 23.39. 863 osoby miały jedno dziecko (1). Średnia wartość BMI tej grupy wynosiła 25.08. 1370 osób miało dwoje dzieci (2). Średnia wartość BMI tej grupy wynosiła 26.12. 1030 miało troje oraz więcej dzieci (3 i więcej). Średnia wartość BMI tej grupy wynosiła 26.51. Po wykonaniu testu Kruskal'a-Wallis'a pomiędzy tymi czterema grupami, wykazano istotną różnicę statystyczną ($p.value < 0.05$) pomiędzy tymi dwoma zmiennymi. Możemy zaobserwować po wartości średnich BMI, że im więcej dana osoba ma dzieci tym wyższe ma BMI, a zatem liczba dzieci wpływa na wartości BMI.

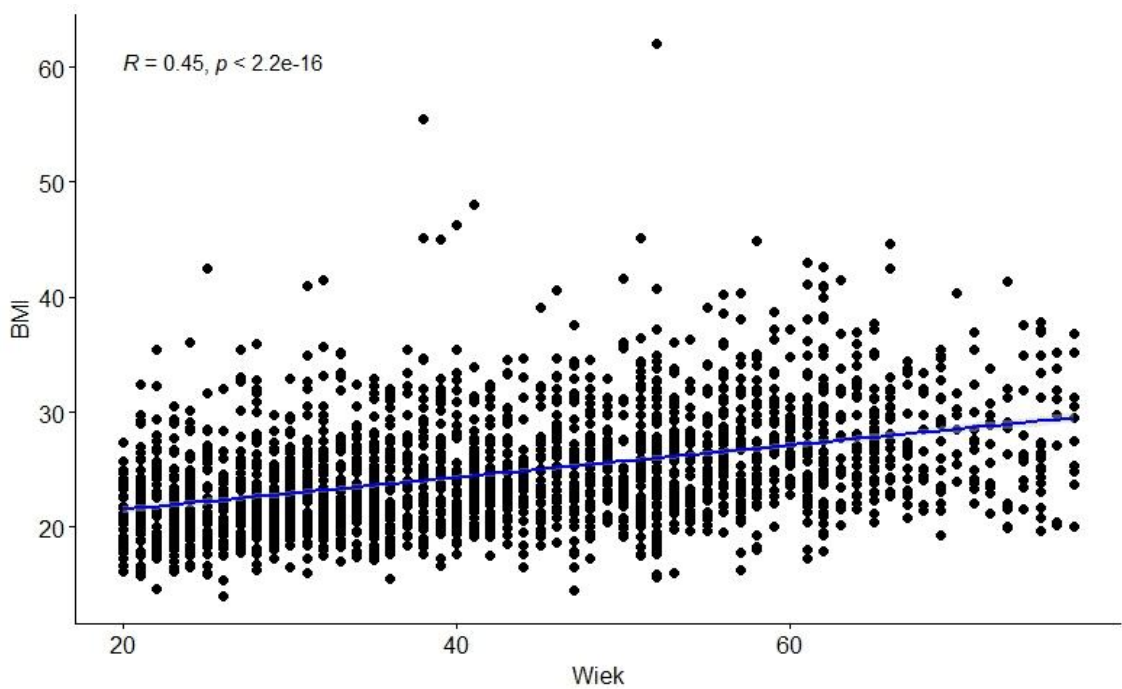
Następnie wykonano charakterystykę grupy badanej w podziale na płeć. Wyniki przedstawione są w Tabela 9 oraz Tabela 10.

Zmienna	Wynik	Test Zmienna : BMI		
		Typ Testu	Test Statystyczny	P
Wiek (Średnia, SD)	42.8±14.7	Korelacja Spearmana	Rho=0.45	4.61x ¹⁰ -124
		Regresja Liniowa	t= 22.29	<2x10 ⁻¹⁶
BMI (Średnia, SD)	24.7±4.9	-		
Grupa BMI (n)	142/1311/653/339	-		
Liczba dzieci (n)	585/518/754/587			
(Średnia BMI, SD)	22.6±4.2/24.12±4.96/25.41±4.37/26.4±5.03	Kruskall-Wallis	H=255.36	4.55x10 ⁻⁵⁴

Tabela 9. Charakterystyka grupy badanej mężczyzn (N=2445).

Średnia wartość BMI w grupie badanej wynosiła 24.7 przy odchyleniu standardowym 4.9. W grupie badanej 142 osoby miały niedowagę (1), 1311 osób miało wagę prawidłową (2), 653 osób miało nadwagę (3), a 339 miało otyłość (4).

W grupie badanej średnia wieku wynosiła 42.8 lata przy odchyleniu standardowym 14.7. Po wykonaniu regresji liniowej oraz korelacji Spearmana, pomiędzy wiekiem, a wartością numeryczną BMI wykazano istotną różnicę statystyczną (p.value < 0.05) pomiędzy tymi dwoma zmiennymi, zatem możemy wyciągnąć wniosek, że wiek lub rok urodzenia wpływa na wartości BMI. Wartość rho dla wyniku korelacji jest dodatnia (Rycina 3), zatem wiek rośnie wraz ze wzrostem wartości BMI. Analiza pomiędzy wiekiem, a BMI została wykonana na grupie badanej liczącej 2422, ponieważ usunięto osoby, które nie miały podanego wieku.



Rycina 8. Korelacja Spearmana pomiędzy wiekiem, a BMI w grupie badanej mężczyzn. (Linia trendu regresji liniowej jest pokazana tylko dla ilustracji) N=2422.

W grupie badanej 585 osób nie miało dzieci (0). Średnia wartości BMI tej grupy wynosiła 22.6. 518 osób miało jedno dziecko (1). Średnia wartość BMI tej grupy wynosiła 24.12. 754 osoby miały dwoje dzieci (2). Średnia wartość BMI tej grupy wynosiła 25.41. 587 miało troje oraz więcej dzieci (3 i więcej). Średnia wartość BMI tej grupy wynosiła 26.4. Po wykonaniu testu Kruskal'a-Wallis'a pomiędzy tymi czterema grupami, wykazano istotną różnicę statystyczną ($p.value < 0.05$) pomiędzy tymi dwoma zmiennymi. Możemy zaobserwować po wartości średnich BMI, że im więcej dana osoba ma dzieci tym wyższe ma BMI, a zatem liczba dzieci wpływa na wartości BMI lub BMI wpływa na liczbę dzieci.

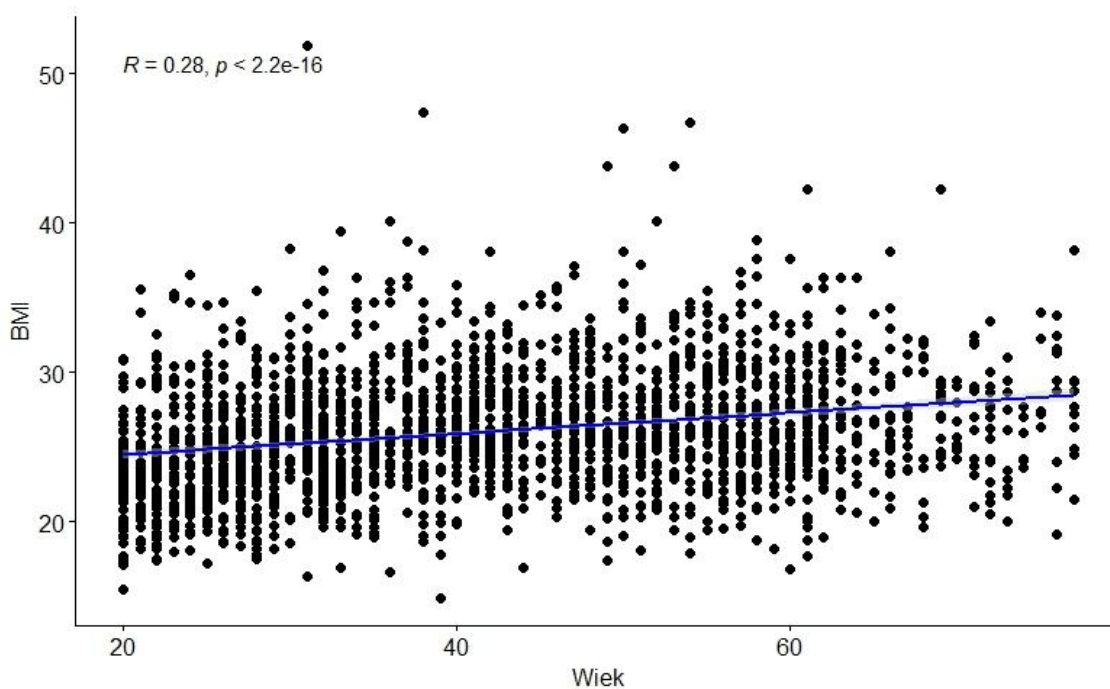
Następnie wykonano charakterystykę dla grupy badanej mężczyzn. Wyniki przedstawia Tabela 10.

Zmienna	Wynik	Test Zmienna : BMI		
		Typ Testu	Test Statystyczny	P
Wiek (Średnia, SD)	41.9±14.7	Korelacja Spearmana	Rho=0.28	4.84x10 ⁻⁴³
		Regresja Liniowa	t= 12.492	<2x10 ⁻¹⁶
BMI (Średnia, SD)	25.9±4.0	-		
Grupa BMI (n)	33/961/931/352	-		
Liczba dzieci (n)	873/345/616/443			
(Średnia BMI, SD)	24.7±3.8/26.51±4.04/26.98±3.98/26.65±4.01	Kruskall-Wallis	H=157.78	5.53x10 ⁻³⁴

Tabela 10. Charakterystyka grupy badanej kobiet(N=2277).

Średnia wartość BMI w grupie badanej wynosiła 25.9 przy odchyleniu standardowym 4.0. W grupie badanej 33 osoby miały niedowagę (1), 961 osób miało wagę prawidłową (2), 931 osób miało nadwagę (3), a 352 miało otyłość (4).

W grupie badanej średnia wieku wynosiła 41.71 lat przy odchyleniu standardowym 15.1. Po wykonaniu regresji liniowej oraz korelacji Spearmana, pomiędzy wiekiem, a wartością numeryczną BMI wykazano istotną różnicę statystyczną (p.value < 0.05) pomiędzy tymi dwoma zmiennymi, zatem możemy wyciągnąć wniosek, że wiek lub rok urodzenia wpływa na wartości BMI. Wartość rho dla wyniku korelacji jest dodatnia (Rycina 4), zatem wiek rośnie wraz ze wzrostem wartości BMI. Analiza pomiędzy wiekiem, a BMI została wykonana na grupie badanej liczącej 2265, ponieważ usunięto osoby, które nie miały podanego wieku.



Rycina 9. Korelacja Spearmana pomiędzy wiekiem, a BMI w grupie badanej kobiet.

(Linia trendu regresji liniowej jest pokazana tylko dla ilustracji). N=2265.

W grupie badanej 873 osoby nie miało dzieci (0). Średnia wartości BMI tej grupy wynosiła 24.7. 345 osób miało jedno dziecko (1). Średnia wartość BMI tej grupy wynosiła 26.51. 616 osób miało dwoje dzieci (2). Średnia wartość BMI tej grupy wynosiła 26.98. 443 osoby miały troje oraz więcej dzieci (3 i więcej). Średnia wartość BMI tej grupy wynosiła 26.65. Po wykonaniu testu Kruskal'a-Wallis'a pomiędzy tymi czterema grupami, wykazano istotną różnicę statystyczną (p.value < 0.05) pomiędzy tymi dwoma zmiennymi. Możemy zaobserwować po wartości średnich BMI, że im więcej dana osoba ma dzieci tym wyższe ma BMI, a zatem liczba dzieci wpływa na wartości BMI lub BMI wpływa na liczbę dzieci.

3.2 Analiza obszaru inwersji genetycznej na chromosomie 16 i BMI.

SNP	Allel Dominujący/ Recesywny	HWE	Brakujące dane	Komentarz	Model Dominujący	Model Recesywny	Model Przewagi heterozygoty	Model Log-addytywny	Model Dominujący Test Cochran	Model Dominujący Test Fisher	Model Recesywny Test Cochran	Model Recesywny Test Fisher	Model Dominujący Regresja liniowa	Model Dominujący Regresja logistyczna	Model Recesywny Regresja liniowa	Model Recesywny Regresja logistyczna
rs149299	T/C	52.9	0.976	-	0.291	0.077	0.602	0.087	0.732	0.813	0.732	0.81	0.339	0.337	0.295	0.296
rs151179	A/G	52.6	0.930	-	0.251	0.086	0.689	0.082	0.251	0.519	0.086	0.237	0.281	0.28	0.311	0.311
rs77595156	T/C	95	0.285	-	0.117	0.09	0.179	0.079	0.758	0.982	0.758	0.982	0.486	0.488	0.199	0.187
rs151181	A/G	52.6	0.907	-	0.227	0.086	0.728	0.075	0.227	0.479	0.086	0.236	0.25	0.248	0.321	0.322
rs201407601	G	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs144770450	C/T	100	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs11552531	T	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs137906617	G/A	100	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs201225986	A/G	100	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs200346089	G/A	100	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs151136790	A/G	99	0.360	-	0.607	0.07	0.478	0.75	0.607	0.256	0.07	0.183	0.487	0.487	0.487	0.486
rs200832612	G/A	99.9	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs112010846	C	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs61753940	A/G	100	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs201730712	A/G	99.7	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs200890256	T/C	50	1	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs40837	G/A	52.4	0.465	-	0.141	0.453	0.494	0.168	0.37	0.639	0.37	0.638	0.553	0.554	0.546	0.545

Tabela 11. Analiza obszaru inwersji genetycznej na chromosomie 16 i BMI.

Wykonano analizę statystyczną obszaru inwersji genetycznej, w której znajduje się 17 SNP'ów oraz BMI. Po wykonaniu testów statystycznych modelu genetycznego i BMI, nie osiągnięto progu istotności statystycznej.

Następnie wykonano analizę pomiędzy grupą badanych z wagą prawidłową i otyłością. Wyniki przedstawia Tabela 12:

SNP	Komentarz	Model Dominujący	Model Recesywny	Model Przewagi heterozygoty	Model Log-addytywny
rs149299	-	0.293	0.043	0.455	0.061
rs151179	-	0.285	0.055	0.51	0.068
rs77595156	-	0.082	0.364	0.131	0.133
rs151181	-	0.253	0.055	0.553	0.061
rs201407601	Monomorficzny	-	-	-	-
rs144770450	-	-	-	-	-
rs11552531	Monomorficzny	-	-	-	-
rs137906617	-	-	-	-	-
rs201225986	-	-	-	-	-
rs200346089	-	-	-	-	-
rs151136790	-	0.708	0.233	0.895	0.281
rs200832612	-	-	-	-	-
rs112010846	Monomorficzny	-	-	-	-
rs61753940	-	-	-	-	-
rs201730712	-	-	-	-	-
rs40837	-	0.164	0.483	0.511	0.192

Tabela 12. Analiza obszaru inwersji genetycznej na chromosomie 16 i grupy badanych z wagą prawidłową i otyłością.

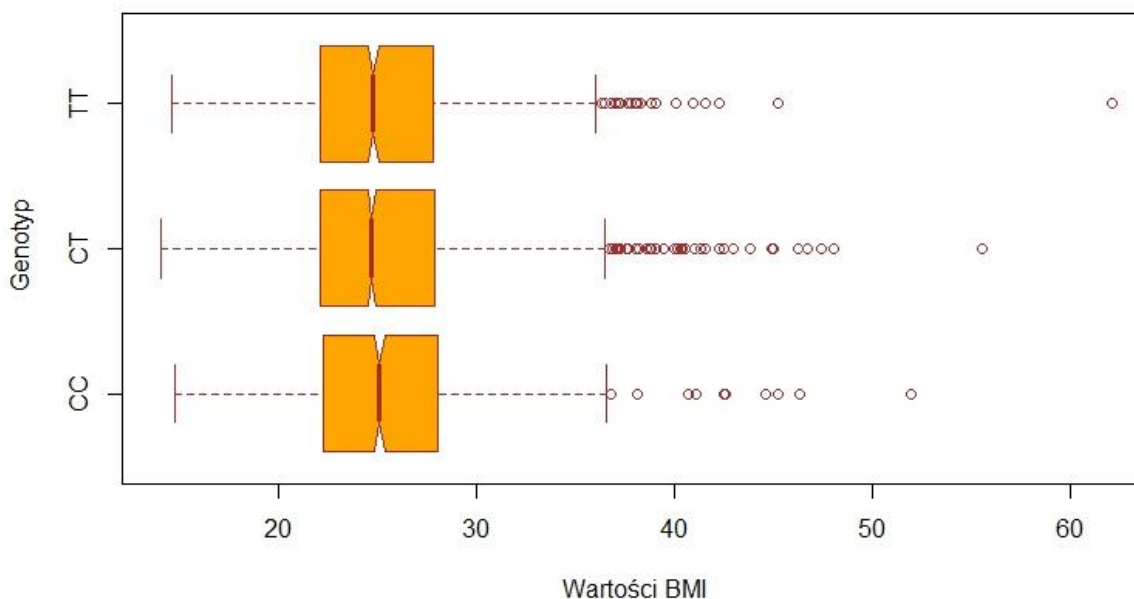
Powyższa analiza wykazała, że RS149299 osiągnął istotność statystyczną przy wyborze modelu recesywnego ($P= 0.043$). Reszta badanych SNP'ów nie osiągnęła progu istotności statystycznej.

Następnie wykonano szczegółową analizę RS149299 za pomocą programu SNPAssoc, który osiągnął istotność statystyczną oraz obliczono średnią wartość BMI i odchylenie standardowe dla poszczególnych genotypów. Wyniki przedstawia Tabela 13 i Rycina 10:

Model	Waga Normalna (N)	%	Otyłość (N)	%	OR	Lower	Upper	P-value	AIC
Dominujący	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T/T	638	28,1	180	26	1	-	-	0,293	3221,5
C/T-C/C	1634	71,9	511	74	1,11	0,91	1,34		
Recesywny	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T/T-C/T	1796	79	521	75,4	1	-	-	0,043	3218,5
C/C	476	21	170	24,6	1,23	1,01	1,5		
Przewagi heterozygoty	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T/T-C/C	1114	49	350	50,7	1	-	-	0,455	3222
C/T	1158	51	341	49,3	0,94	0,79	1,11		
Log-Addytywny	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,1,2	2272	76,7	691	23,3	1,12	0,99	1,27	0,061	3219,1

OR – Iloraz Szans , Lower – dolny przedział ufności, Upper – górny przedział ufności, P-value – istotność statystyczna, AIC - Kryterium informacyjne Akaikiego.

Tabela 13. Szczegółowa analiza RS149299 i wybranych modeli genetycznych dla grupy badanych z wagą normalną i otyłością.



Rycina 10. Boxplot dla wartości BMI dla RS149299.

W modelu recesywnym, który osiągnął istotność statystyczną, 79% badanych z wagą normalną miało genotyp TT/TC, a 21% badanych genotyp CC. W grupie osób z otyłością 75,4 % miało genotyp TT/TC, a 24,6 % genotyp C/C. Za poprawnością wyboru modelu recesywnego również przemawia AIC, które ma najmniejszą wartość. Średnia wartość BMI dla genotypu TT wyniosła 25.23 przy odchyleniu standardowym 4.4, dla genotypu CT wyniosła 25.33 przy

odchyleniu standardowym 4.6, a dla genotypu CC wyniosła 25.45 przy odchyleniu standardowym 4.5.

Z uwagi na to, że na wartości BMI wpływa wiek oraz płeć wykonano analizę z dostosowaniem do tych parametrów. Tabela 14 przedstawia dostosowane wyniki:

Model	Waga Normalna (N)	%	Otyłość (N)	%	OR	Lower	Upper	P-value	AIC
Dominujący	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T/T	638	28,1	180	26	1	-	-	0,279	3207,4
C/T-C/C	1634	71,9	511	74	1,11	0,92	1,35		
Recesywny	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T/T-C/T	1796	79	521	75,4	1	-	-	0,039	3204,3
C/C	476	21	170	24,6	1,24	1,01	1,51		
Przewagi heterozygoty	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T/T-C/C	1114	49	350	50,7	1	-	-	0,448	3208
C/T	1158	51	341	49,3	0,94	0,79	1,11		
Log-Addytywny	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,1,2	2272	76,7	691	23,3	1,13	1	1,27	0,055	3204,9

OR – Iloraz Szans, Lower – dolny przedział ufności, Upper – górny przedział ufności, P-value – istotność statystyczna, AIC - Kryterium informacyjne Akaikiego.

Tabela 14. Szczegółowa analiza RS149299 i wybranych modeli genetycznych z dostosowaniem do płci i wieku dla grupy badanych z wagą normalną i otyłością.

Po zastosowaniu korekty względem płci i wieku, można zauważyć obniżenie wartości p.value do 0.039, a więc model recesywny również w tym przypadku osiągnął istotność statystyczną, która jest nawet większa niż poprzednio. Również patrząc na średnie wartości BMI dla genotypu CC, są one najwyższe. Przemawia to za tym, że w przypadku RS 149299 model recesywny może predysponować do otyłości w populacji Polskiej.

Następnie wykonano analizę pomiędzy grupą badanych z wagą prawidłową i niedowagą. Wyniki przedstawia Tabela 15:

SNP	Komentarz	Model Dominujący	Model Recesywny	Model Przewagi heterozygoty	Model Log-addytywny
rs149299	-	0.435	0.444	0.180	0.956
rs151179	-	0.392	0.504	0.183	0.874
rs77595156	-	0.346	1	0.413	0.714
rs151181	-	0.392	0.504	0.183	0.874
rs201407601	Monomorficzny	-	-	-	-
rs144770450	-	-	-	-	-
rs11552531	Monomorficzny	-	-	-	-
rs137906617	Monomorficzny	-	-	-	-
rs201225986	Monomorficzny	-	-	-	-
rs200346089	Monomorficzny	-	-	-	-
rs151136790	Monomorficzny	-	-	-	-
rs200832612	Monomorficzny	-	-	-	-
rs112010846	Monomorficzny	-	-	-	-
rs61753940	Monomorficzny	-	-	-	-
rs201730712	Monomorficzny	-	-	-	-
rs40837	-	0.55	0.657	0.372	0.917

Tabela 15. Analiza obszaru inwersji genetycznej na chromosomie 16 i grupy badanych z wagą prawidłową i niedowagą.

Powyższe badanie, wykazało, że żaden SNP nie osiągnął progu istotności statystycznej, zatem z tej analizy nie możemy wywnioskować, że jakkolwiek RS predysponuje do wagi prawidłowej lub niedowagi, gdy porównuje się te dwie grupy.

Następnie wykonano analizę pomiędzy grupą badanych z wagą niedowagą i otyłością. Wyniki przedstawia Tabela 16:

SNP	Komentarz	Model Dominujący	Model Recesywny	Model Przewagi heterozygoty	Model Log-addytywny
rs149299	-	0.205	0.745	0.389	0.323
rs151179	-	0.178	0.716	0.371	0.289
rs77595156	Monomorficzny	-	-	-	-
rs151181	-	0.166	0.716	0.353	0.277
rs201407601	Monomorficzny	-	-	-	-
rs144770450	Monomorficzny	-	-	-	-
rs11552531	Monomorficzny	-	-	-	-
rs137906617	Monomorficzny	-	-	-	-
rs201225986	Monomorficzny	-	-	-	-
rs200346089	Monomorficzny	-	-	-	-
rs151136790	-	0.154	1	0.119	0.323
rs200832612	Monomorficzny	-	-	-	-
rs112010846	Monomorficzny	-	-	-	-
rs61753940	Monomorficzny	-	-	-	-
rs201730712	Monomorficzny	-	-	-	-
rs40837	-	0.863	0.439	0.624	0.571

Tabela 16. Analiza obszaru inwersji genetycznej na chromosomie 16 i grupy badanych z niedowagą oraz otyłością.

Powyższe badanie, wykazało, że żaden SNP nie osiągnął progu istotności statystycznej, zatem z tej analizy nie możemy wywnioskować, że jakkolwiek RS predysponuje do niedowagi lub otyłości, gdy porównuje się te dwie grupy.

Następnie wykonano analizę pomiędzy grupą badanych z wagą prawidłową i nadwagą. Wyniki przedstawia Tabela 17:

SNP	Komentarz	Model Dominujący	Model Recesywny	Model Przewagi heterozygoty	Model Log-addytywny
rs149299	-	0.205	0.745	0.389	0.323
rs151179	-	0.178	0.716	0.371	0.289
rs77595156	Monomorficzny	-	-	-	-
rs151181	-	0.166	0.716	0.353	0.277
rs201407601	Monomorficzny	-	-	-	-
rs144770450	Monomorficzny	-	-	-	-
rs11552531	Monomorficzny	-	-	-	-
rs137906617	Monomorficzny	-	-	-	-
rs201225986	Monomorficzny	-	-	-	-
rs200346089	Monomorficzny	-	-	-	-
rs151136790	-	0.154	1	0.119	0.323
rs200832612	Monomorficzny	-	-	-	-
rs112010846	Monomorficzny	-	-	-	-
rs61753940	Monomorficzny	-	-	-	-
rs201730712	Monomorficzny	-	-	-	-
rs40837	-	0.121	0.964	0.18	0.313

Tabela 17. Analiza obszaru inwersji genetycznej na chromosomie 16 i grupy badanych z wagą prawidłową i nadwagą.

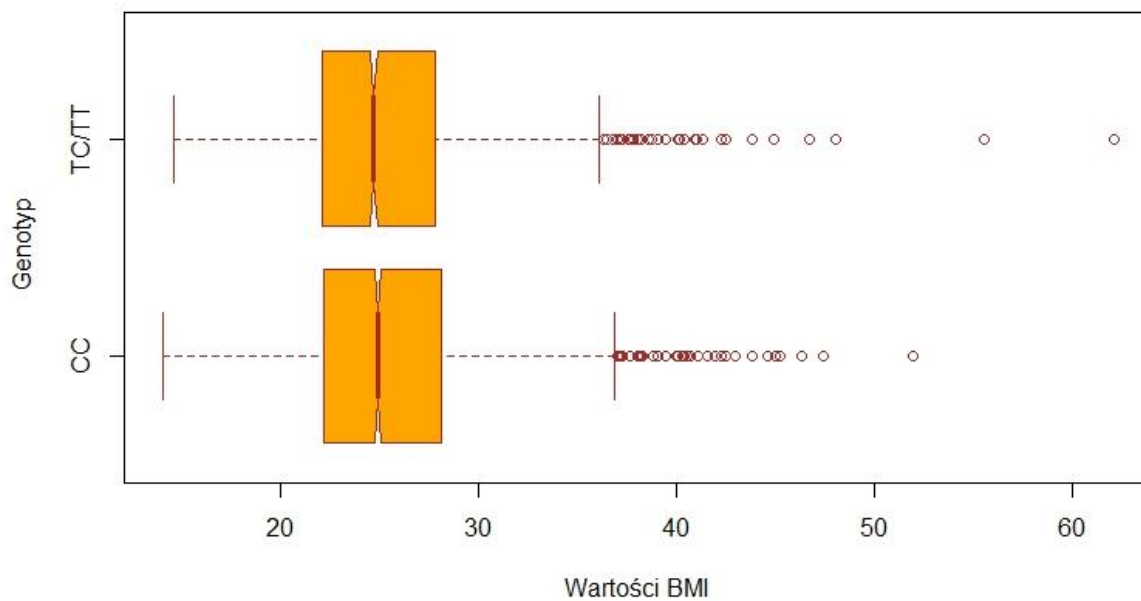
Powyższe badanie, wykazało, że żaden SNP nie osiągnął progu istotności statystycznej, zatem z tej analizy nie możemy wywnioskować, że jakkolwiek RS predysponuje do wagi prawidłowej lub nadwagi, gdy porównuje się te dwie grupy.

3.3 Analiza genu TUFM i BMI.

SNP	Allel Dominujący/ Recesywny	HWE	Brakujące	Komentarz	Model Dominujący	Model Recesywny	Model Przewagi heterozygoty	Model Log-addytywny	Model Dominujący Test Cochran	Model Dominujący Test Fisher	Model Recesywny Test Cochran	Model Recesywny Test Fisher	Model Dominujący Regresja liniowa	Model Dominujący Regresja logistyczna	Model Recesywny Regresja liniowa	Model Recesywny Regresja logistyczna
rs146326033	T	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs143189885	C	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs201756974	T	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs8061877	C/T	78.2	0.737	-	0.025	0.254	0.072	0.022	0.025	0.103	0.254	0.348	0.037	0.037	0.447	0.437
rs150844967	C	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs116562140	C/T	100	1	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 18. Analiza genu TUFM i BMI.

Wykonano analizę statystyczną genu TUFM (6 SNP) i BMI. Po wykonaniu testów statystycznych modelu genetycznego i BMI, istotność statystyczną osiągnął rs8061877 w modelu dominującym (P= 0.025), w modelu log-addytywnym (P=0.022), w modelu dominującym przy użyciu testu Cochran'a (P= 0.025) oraz przy użyciu regresji liniowej (P= 0.037) oraz logistycznej (P= 0.037). Reszta badanych SNP'ów nie osiągnęła progu istotności statystycznej. Rycina 11 przedstawia dane dla modelu dominującego dla RS8061877:



Rycina 11. Boxplot dla modelu dominującego i wartości BMI dla RS8061877.

W grupie osób z genotypem CC średnia BMI wynosiła 25.44 przy odchyleniu standardowym 4.51. Mediana wynosiła 24.91. W grupie osób z genotypem TC/TT średnia BMI wynosiła 25.23 przy odchyleniu standardowym 4.62. Mediana wynosiła 24.67. Przemawia to za tym, że w przypadku RS8061877 model dominujący może predysponować do zwiększonej wagi w populacji Polskiej.

Następnie wykonano analizę pomiędzy grupą badanych z wagą prawidłową i otyłością. Wyniki przedstawia Tabela 19:

SNP	Komentarz	Model Dominujący	Model Recesywny	Model Przewagi heterozygoty	Model Log-addytywny
rs146326033	Monomorficzny	-	-	-	-
rs143189885	Monomorficzny	-	-	-	-
rs201756974	Monomorficzny	-	-	-	-
rs8061877	-	0.034	0.756	0.041	0.059
rs150844967	Monomorficzny	-	-	-	-
rs116562140	Monomorficzny	-	-	-	-

Tabela 19. Analiza genu TUFM i grupy badanych z wagą prawidłową i otyłością.

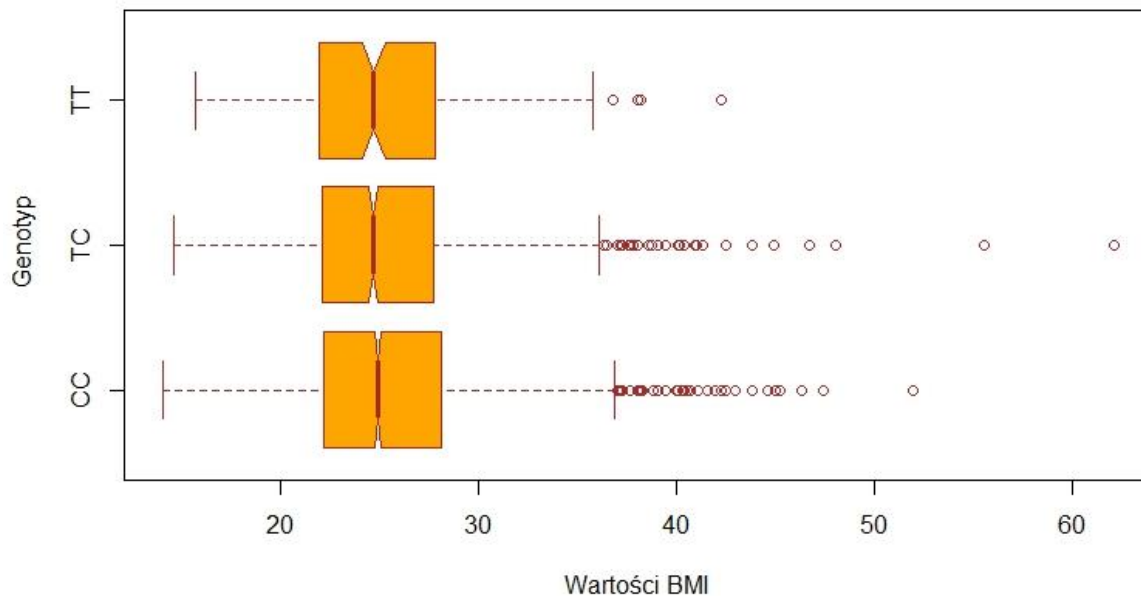
Powyższa analiza wykazała, że RS8061877 osiągnął istotność statystyczną przy wyborze modelu dominującego i przewagi heterozygoty ($P=0.034$ i 0.041) w porównaniu grupy z wagą normalną i otyłością. Reszta badanych SNP'ów nie osiągnęła progu istotności statystycznej.

Następnie wykonano szczegółową analizę RS8061877 za pomocą programu SNPAssoc, który osiągnął istotność statystyczną oraz obliczono średnią wartość BMI i odchylenie standardowe dla poszczególnych genotypów. Wyniki przedstawia Tabela 20 i Rycina 12:

Model	Waga Normalna (N)	%	Otyłość (N)	%	OR	Lower	Upper	P-value	AIC
Dominujący									
C/C	1430	60.4	475	64.7	1			0.034	3394.1
T/C-T/T	938	39.6	259	35.3	0.83	0.7	0.99		
Recesywny									
C/C-T/C	2255	95.2	701	95.5	1			0.756	3398.4
T/T	113	4.80	33	4.50	0.94	0.63	1, 4		
Przewagi heterozygoty									
C/C-T/T	1543	65.2	508	69.2	1			0.041	3394.4
T/C	825	34.8	226	30.80	0.83	0.7	0.99		
Log-Addytywny									
0,1,2	2368	76.3	734	44765.00	0.87	0.75	1, 01	0.059	3395

OR – Iloraz Szans , Lower – dolny przedział ufności, Upper – górny przedział ufności, P-value – istotność statystyczna, AIC - Kryterium informacyjne Akaikiego.

Tabela 20. Szczegółowa analiza RS8061877 i wybranych modeli genetycznych dla grupy badanych z wagą normalną i otyłością .



Rycina 12. Boxplot dla wartości BMI dla RS8061877.

W modelu dominującym, który osiągnął istotność statystyczną, 60.4% badanych z wagą normalną miało genotyp CC, a 4,8% badanych genotyp TC/TT. W grupie osób z otyłością 64.7 % miało genotyp CC, a 4,5 % genotyp TC/TT. W modelu przewagi heterozygoty, który osiągnął istotność statystyczną, 65.2% badanych z wagą normalną miało genotyp CC/TT, a 34.8 badanych genotyp TC. W grupie osób z otyłością 69.2 % miało genotyp CC/TT a 30.8% genotyp TC. Jednakże, za poprawnością wyboru modelu dominującego przemawia AIC, które ma najmniejszą wartość, właśnie przy tym modelu. Średnia wartość BMI dla genotypu CC wyniosła 25.44 przy odchyleniu standardowym 4.5, dla genotypu TC wyniosła 25.26 przy odchyleniu standardowym 4.6, a dla genotypu TT wyniosła 25.01 przy odchyleniu standardowym 4.5.

Z uwagi na to , że na wartości BMI wpływa wiek oraz płeć wykonano analizę z dostosowaniem do tych parametrów. Tabela 21 przedstawia wyniki:

Model	Waga Normalna (N)	%	Otyłość(N)	%	OR	Lower	Upper	P-value	AIC
Dominujący									
C/C	1430	60.4	475	64.7	1			0.032	3371
T/C-T/T	938	39.6	259	35.3	0.83	0.7	0.99		
Recesywny									
C/C-T/C	2255	95.2	701	95.5	1			0.694	3375.5
T/T	113	4.80	33	4.50	0.92	0.62	1, 38		
Przewagi heterozygoty									
C/C-T/T	1543	65.2	508	69.2	1			0.042	3371.5
T/C	825	34.8	226	30.80	0.83	0.7	1		
Log-Addytywny									
0,1,2	2368	76.3	734	44765.00	0.87	0.75	1	0.053	3371.9

OR – Iloraz Szans , Lower – dolny przedział ufności, Upper – górny przedział ufności, P-value – istotność statystyczna, AIC - Kryterium informacyjne Akaikiego.

Tabela 21. Szczegółowa analiza RS8061877 i wybranych modeli genetycznych z dostosowaniem do płci i wieku dla grupy badanych z wagą normalną i otyłością .

Po zastosowaniu korekty względem płci i wieku, można zauważyć obniżenie wartości p.value do 0.032 przy modelu dominującym oraz nieznacznie obniżenie wartości p.value w modelu przewagi heterozygoty. Również genotyp CC miał największą średnią wartość BMI. Przemawia to za tym, że w przypadku RS8061877 model dominujący może predysponować do otyłości w populacji Polskiej.

Następnie wykonano analizę pomiędzy grupą badanych z wagą prawidłową i niedowagą. Wyniki przedstawia Tabela 22:

SNP	Komentarz	Model Dominujący	Model Recesywny	Model Przewagi heterozygoty	Model Log-addytywny
rs146326033	Monomorficzny	-	-	-	-
rs143189885	Monomorficzny	-	-	-	-
rs201756974	Monomorficzny	-	-	-	-
rs8061877	-	0.315	0.178	0.698	0.178
rs150844967	Monomorficzny	-	-	-	-
rs116562140	Monomorficzny	-	-	-	-

Tabela 22. Analiza genu TUFM i grupy z wagą prawidłową i niedowagą.

Powyższe badanie, wykazało, że żaden SNP nie osiągnął progu istotności statystycznej, zatem z tej analizy nie możemy wywnioskować, że jakkolwiek RS predysponuje do wagi prawidłowej lub niedowagi, gdy porównuje się te dwie grupy.

Następnie wykonano analizę pomiędzy grupą badanych z niedowagą i otyłością. Wyniki przedstawia Tabela 23:

SNP	Komentarz	Model Dominujący	Model Recesywny	Model Przewagi heterozygoty	Model Log-addytywny
rs146326033	Monomorficzny	-	-	-	-
rs143189885	Monomorficzny	-	-	-	-
rs201756974	Monomorficzny	-	-	-	-
rs8061877	-	0.043	0.16	0.159	0.029
rs150844967	Monomorficzny	-	-	-	-
rs116562140	Monomorficzny	-	-	-	-

Tabela 23. Analiza genu TUFM i grupy z niedowagą i otyłością.

Powyższa analiza wykazała, że RS8061877 osiągnął istotność statystyczną przy wyborze modelu dominującego i log-addytywnego ($P= 0.043$ i 0.029). Reszta badanych SNP'ów nie osiągnęła progu istotności statystycznej.

Następnie wykonano szczegółową analizę RS8061877 za pomocą programu SNPAssoc, który osiągnął istotność statystyczną. Wyniki przedstawia Tabela 24:

Model	Niedowaga (N)	%	Otyłość(N)	%	OR	Lower	Upper	P-value	AIC
Dominujący	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C/C	103	56,6	475	64,7	1	-	-	0,043	913,3
T/C-T/T	79	43,4	259	35,3	0,71	0,51	0,99		
Recesywny	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C/C-T/C	169	92,9	701	95,5	1	-	-	0,16	915,4
T/T	13	7,1	33	4,5	0,61	0,32	1,19		
Przewagi heterozygoty	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C/C-T/T	116	63,7	508	69,2	1	-	-	0,159	915,4
T/C	66	36,3	226	30,8	0,78	0,56	1,1		
Log-Addytywny	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0 - CC	103	56,6	475	64,7	0,74	0,57	0,97	0,031	844,9
1 - TC	66	36,3	226	30,8					
2 - TT	13	7,1	33	4,5					

OR – Iloraz Szans , Lower – dolny przedział ufności, Upper – górny przedział ufności, P-value – istotność statystyczna, AIC - Kryterium informacyjne Akaikiego.

Tabela 24. Szczegółowa analiza RS8061877 i wybranych modeli genetycznych dla grupy badanych z niedowagą otyłością .

W modelu dominującym, który osiągnął istotność statystyczną, 56.6% badanych z niedowagą miało genotyp CC, a 7.1% badanych genotyp TC/TT. W grupie osób z otyłością 64.7 % miało genotyp CC, a 4.5 % genotyp TC/TT. W modelu addytywnym w grupie osób z niedowagą 56.6% miało genotyp CC, 36.3% miało genotyp TC, a 7,1% miało genotyp TT. W grupie z otyłością 64.7% miało genotyp CC, 30.8% miało genotyp TC, a 4.5% miało genotyp TT.

Z uwagi na to, że na wartości BMI wpływa wiek oraz płeć wykonano analizę z dostosowaniem do tych parametrów. Tabela 25 przedstawia wyniki:

Model	Niedowaga (N)	%	Otyłość(N)	%	OR	Lower	Upper	P-value	AIC
Dominujący	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C/C	103	56,6	475	64,7	1	-	-	0,073	846,4
T/C-T/T	79	43,4	259	35,3	0,73	0,52	1,03		
Recesywny	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C/C-T/C	169	92,9	701	95,5	1	-	-	0,072	846,6
T/T	13	7,1	33	4,5	0,51	0,25	1,03		
Przewagi heterozygoty	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C/C-T/T	116	63,7	508	69,2	1	-	-	0,318	848,6
T/C	66	36,3	226	30,8	0,83	0,59	1,19		
Log-Addytywny	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0 - CC	103	56,6	475	64,7	0,74	0,57	0,97	0,031	844,9
1 - TC	66	36,3	226	30,8					
2 - TT	13	7,1	33	4,5					

OR – Iloraz Szans, Lower – dolny przedział ufności, Upper – górny przedział ufności, P-value – istotność statystyczna, AIC - Kryterium informacyjne Akaikiego.

Tabela 25. Szczegółowa analiza RS8061877 i wybranych modeli genetycznych z dostosowaniem do płci i wieku dla grupy badanych z niedowagą otyłością.

Po zastosowaniu korekty względem płci i wieku, można zauważyć obniżenie wartości p.value do 0.073 przy modelu dominującym. W przypadku RS8061877, model dominujący przy porównaniu osób z niedowagą i nadwagą, dał wynik nieistotny statystycznie. Po korekcie natomiast, wciąż istotny statystycznie jest model addytywny. Aby potwierdzić prawidłowość tego modelu wykonano test statystyczny Fisher Test pomiędzy liczbami osób, który posiadają dany wariant. Wynik testu Fishera wyniósł 0.0775, zatem nie osiągnął progu istotności statystycznej. Przemawia to za tym, że jest to wynik fałszywie dodatni i RS8061877 nie predysponuje do niedowagi lub otyłości, gdy porównuje się te dwie grupy.

Następnie wykonano analizę pomiędzy grupą badanych z wagą prawidłową i niedowagą. Wyniki przedstawia Tabela 26:

SNP	Komentarz	Model Dominujący	Model Recesywny	Model Przewagi heterozygoty	Model Log-addytywny
rs146326033	Monomorficzny	-	-	-	-
rs143189885	Monomorficzny	-	-	-	-
rs201756974	Monomorficzny	-	-	-	-
rs8061877	-	0.68	0.438	0.933	0.533
rs150844967	Monomorficzny	-	-	-	-
rs116562140	Monomorficzny	-	-	-	-

Tabela 26. Analiza genu TUFM i grupy badanych z wagą prawidłową i nadwagą.

Powyższe badanie, wykazało, że żaden SNP nie osiągnął progu istotności statystycznej, zatem z tej analizy nie możemy wywnioskować, że jakikolwiek RS predysponuje do wagi prawidłowej lub nadwagi, gdy porównuje się te dwie grupy.

3.4 Analiza genu SH2B1 i BMI.

SNP	Allel Dominujący/ Recesywny	HWE	Brakujące	Komentarz	Model Dominujący	Model Recesywny	Model Przewagi heterozygoty	Model Log-addytywny	Model Dominujący Test Cochran	Model Dominujący Test Fisher	Model Recesywny Test Cochran	Model Recesywny Test Fisher	Model Dominujący Regresja liniowa	Model Dominujący Regresja logistyczna	Model Recesywny Regresja liniowa	Model Recesywny Regresja logistyczna
rs149091795	C	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs144126859	C/T	100	1	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs141195883	A/G	99.9	1	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs147094247	C	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs199996405	C/A	100	1	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs142515048	T	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs143410496	G	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs190981290	C/T	99.2	1	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 27. Analiza genu SH2B1 i BMI.

Wszystkie wybrane SNP'y są monomorficzne, zatem nie można wykonać analizy statystycznej na tych danych.

3.5 Analiza genu CCDC101 i BMI.

SNP	Allel Dominujący/ Recesywny	HWE	Brakujące	Komentarz	Model Dominujący	Model Recesywny	Model Przewagi heterozygoty	Model Log-addytywny	Model Dominujący Test Cochran	Model Dominujący Test Fisher	Model Recesywny Test Cochran	Model Recesywny Test Fisher	Model Dominujący Regresja liniowa	Model Dominujący Regresja logistyczna	Model Recesywny Regresja liniowa	Model Recesywny Regresja logistyczna
rs146510287	A	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs4788073	T/C	57.3	1	-	0.2	0.339	0.651	0.168	0.205	0.431	0.339	0.195	0.631	0.628	0.843	0.843
variant40184	C	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs11401	T/C	81.8	0.005815	-	0.615	0.047	0.861	0.297	0.615	0.451	0.047	0.094	0.886	0.887	0.144	0.145

Tabela 28. Analiza genu CCDC101 i BMI.

Wykonano analizę statystyczną genu CCDC101(4 SNP) i BMI. Po wykonaniu testów statystycznych modelu genetycznego i BMI, istotność statystyczną osiągnął rs11401 w modelu recesywnym (P= 0.047) oraz w modelu recesywnym przy użyciu testu Cochran'a (P= 0.025). Reszta badanych SNP'ów nie osiągnęła progu istotności statystycznej.

Następnie wykonano analizę pomiędzy grupą badanych z wagą prawidłową i otyłością. Wyniki przedstawia Tabela 29:

SNP	Komentarz	Model Dominujący	Model Recesywny	Model Przewagi heterozygoty	Model Log-addytywny
rs146510287	Monomorficzny	-	-		-
rs4788073	-	0.314	0.178	0.925	0.154
variant40184	Monomorficzny	-	-	-	-
rs11401	-	0.366	0.158	0.675	0.22

Tabela 29. Analiza genu CCDC101 i grupy z wagą prawidłową i otyłością.

Powyższe badanie, wykazało, że żaden SNP nie osiągnął progu istotności statystycznej, zatem z tej analizy nie możemy wywnioskować, że jakkolwiek RS predysponuje do wagi prawidłowej lub otyłości, gdy porównuje się te dwie grupy.

Następnie wykonano analizę pomiędzy grupą badanych z wagą normalną i niedowagą. Wyniki przedstawia Tabela 30:

SNP	Komentarz	Model Dominujący	Model Recesywny	Model Przewagi heterozygoty	Model Log-addytywny
rs146510287	Monomorficzny	-	-		-
rs4788073	-	0.256	0.117	0.021	0.918
variant40184	Monomorficzny	-	-	-	-
rs11401	-	0.168	0.81	0.185	0.2

Tabela 30. Analiza genu CCDC101 i grupy z wagą prawidłową i niedowagą.

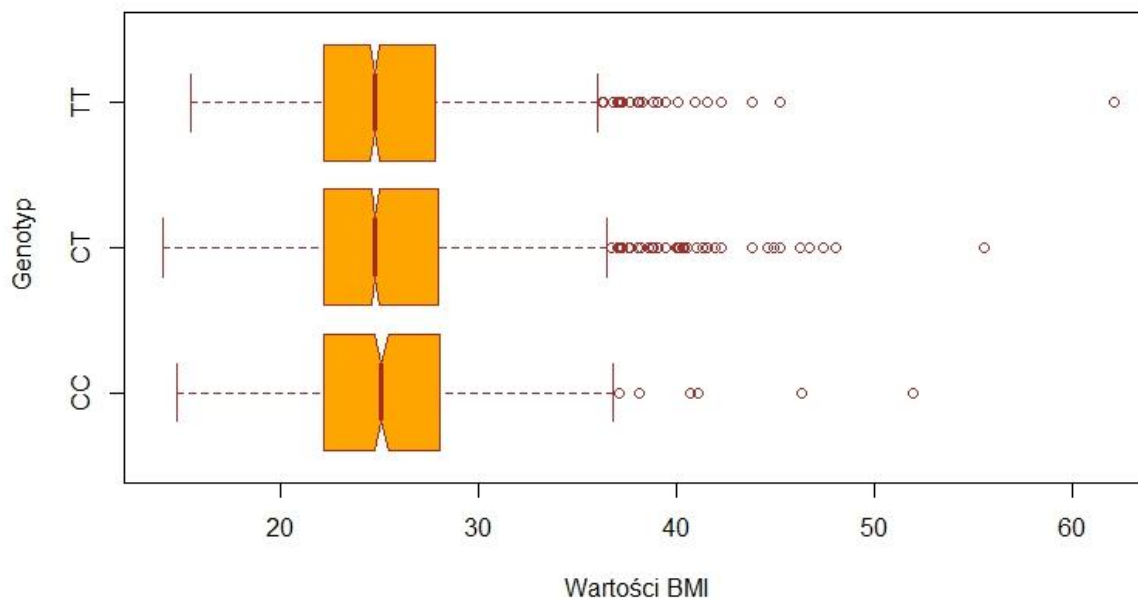
Powyższa analiza wykazała, że RS4788073 osiągnął istotność statystyczną przy wyborze modelu przewagi heterozygoty(P= 0.021). Reszta badanych SNP'ów nie osiągnęła progu istotności statystycznej.

Następnie wykonano szczegółową analizę RS4788073 za pomocą programu SNPAssoc, który osiągnął istotność statystyczną oraz obliczono średnią wartość BMI i odchylenie standardowe dla poszczególnych genotypów. Wyniki przedstawia Tabela 31 oraz Rycina 13:

Model	Niedowaga (N)	%	Waga Normalna(N)	%	OR	Lower	Upper	P-value	AIC
Dominujący	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T/T	63	37,3	630	32,9	1	-	-	0,256	1175,2
C/T-C/C	106	62,7	1282	67,1	1,21	0,87	1,68		
Recesywny	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T/T-C/T	132	78,1	1587	83	1	-	-	0,117	1174,1
C/C	37	21,9	325	17	0,73	0,5	1,07		
Przewagi heterozygoty	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T/T-C/C	100	59,2	955	49,9	1	-	-	0,021	1171,2
C/T	69	40,8	957	50,1	1,45	1,06	2		
Log-Addytywny	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,1,2	169	8,1	1912	91,9	0,99	0,79	1,24	0,918	1176,5

OR – Iloraz Szans , Lower – dolny przedział ufności, Upper – górny przedział ufności, P-value – istotność statystyczna, AIC - Kryterium informacyjne Akaikiego.

Tabela 31. Szczegółowa analiza RS4788073 i wybranych modeli genetycznych dla grupy badanych z wagą normalną i niedowagą.



Rycina 13 . Boxplot dla wartości BMI dla RS4788073.

W modelu przewagi heterozygoty który osiągnął istotność statystyczną, 59.2% badanych z niedowagą miało genotyp TT/CC, a 40.8% badanych genotyp CT. W grupie osób z wagą prawidłową 49.9 % miało genotyp TT/CC, a 50.1 % genotyp CT. Za poprawnością wyboru przewagi heterozygoty przemawia AIC, które ma najmniejszą wartość, właśnie przy tym modelu. Średnia wartość BMI dla genotypu TT wynosiła 25.28 przy odchyleniu standardowym

4.5, dla genotypu CC wynosiła 25.37 przy odchyleniu standardowym 4.5, a dla genotypu CT wynosiła 25.41 przy odchyleniu standardowym 4.6.

Z uwagi na to, że na wartości BMI wpływa wiek oraz płeć wykonano analizę z dostosowaniem do tych parametrów. Tabela 32 przedstawia wyniki:

Model	Niedowaga (N)	%	Waga Normalna(N)	%	OR	Lower	Upper	P-value	AIC
Dominujący	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T/T	63	37,3	630	32,9	1	-	-	0,249	1143,5
C/T-C/C	106	62,7	1282	67,1	1,22	0,87	1,69		
Recesywny	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T/T-C/T	132	78,1	1587	83	1	-	-	0,147	1142,8
C/C	37	21,9	325	17	0,75	0,51	1,1		
Przewagi heterozygoty	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T/T-C/C	100	59,2	955	49,9	1	-	-	0,025	1139,9
C/T	69	40,8	957	50,1	1,44	1,04	1,99		
Log-Addytywny	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,1,2	169	8,1	1912	91,9	1	0,79	1,25	0,977	1144,9

OR – Iloraz Szans, Lower – dolny przedział ufności, Upper – górny przedział ufności, P-value – istotność statystyczna, AIC - Kryterium informacyjne Akaikiego.

Tabela 32. Szczegółowa analiza RS4788073 i wybranych modeli genetycznych z dostosowaniem do płci i wieku dla grupy badanych z wagą normalną i niedowagą.

Po zastosowaniu korekty względem płci i wieku, można zauważyć nieznacznie podwyższenie wartości p.value do 0.025 przy modelu przewagi heterozygoty. Również średnia wartość BMI dla genotypu CT jest najwyższa. Przemawia to za tym, że w przypadku RS4788073 osoby, które są homozygotami mają większą predyspozycję do niedowagi niż w przypadku osób, które są heterozygotami.

Następnie wykonano analizę pomiędzy grupą badanych z niedowagą i otyłością. Wyniki przedstawia Tabela 33:

SNP	Komentarz	Model Dominujący	Model Recesywny	Model Przewagi heterozygoty	Model Log-addytywny
rs146510287	Monomorficzny	-	-	-	-
rs4788073	-	0.111	0.482	0.038	0.511
variant40184	Monomorficzny	-	-	-	-
rs11401	-	0.431	0.575	0.318	0.593

Tabela 33. Analiza genu CCDC101 i grupy badanych z niedowagą i otyłością.

Powyższa analiza wykazała, że RS4788073 osiągnął istotność statystyczną przy wyborze modelu przewagi heterozygoty (P= 0.048). Reszta badanych SNP'ów nie osiągnęła progu istotności statystycznej.

Następnie wykonano szczegółową analizę RS4788073 który osiągnął istotność statystyczną. Wyniki przedstawia Tabela 34:

Model	Niedowaga (N)	%	Otyłość(N)	%	OR	Lower	Upper	P-value	AIC
Dominujący	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T/T	63	37,3	182	30,7	1	-	-	0,111	807,4
C/T-C/C	106	62,7	410	69,3	1,34	0,94	1,91		
Recesywny	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T/T-C/T	132	78,1	477	80,6	1	-	-	0,482	809,4
C/C	37	21,9	115	19,4	0,86	0,57	1,31		
Przewagi heterozygoty	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T/T-C/C	100	59,2	297	50,2	1	-	-	0,038	805,6
C/T	69	40,8	295	49,8	1,44	1,02	2,04		
Log-Addytywny	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,1,2	169	22,2	592	77,8	1,08	0,85	1,38	0,511	809,5

OR – Iloraz Szans , Lower – dolny przedział ufności, Upper – górny przedział ufności, P-value – istotność statystyczna, AIC - Kryterium informacyjne Akaikiego.

Tabela 34. Szczegółowa analiza RS4788073 i wybranych modeli genetycznych dla grupy badanych z niedowagą i otyłością.

W modelu przewagi heterozygoty który osiągnął istotność statystyczną, 59.2% badanych z niedowagą miało wariant homozygoty TT/CC, a 40.8% badanych wariant heterozygoty CT. W grupie osób z otyłością 50.2 % miało wariant homozygoty, a 49.8 % wariant heterozygoty. Za poprawnością wyboru przewagi heterozygoty przemawia AIC, które ma najmniejszą wartość, właśnie przy tym modelu.

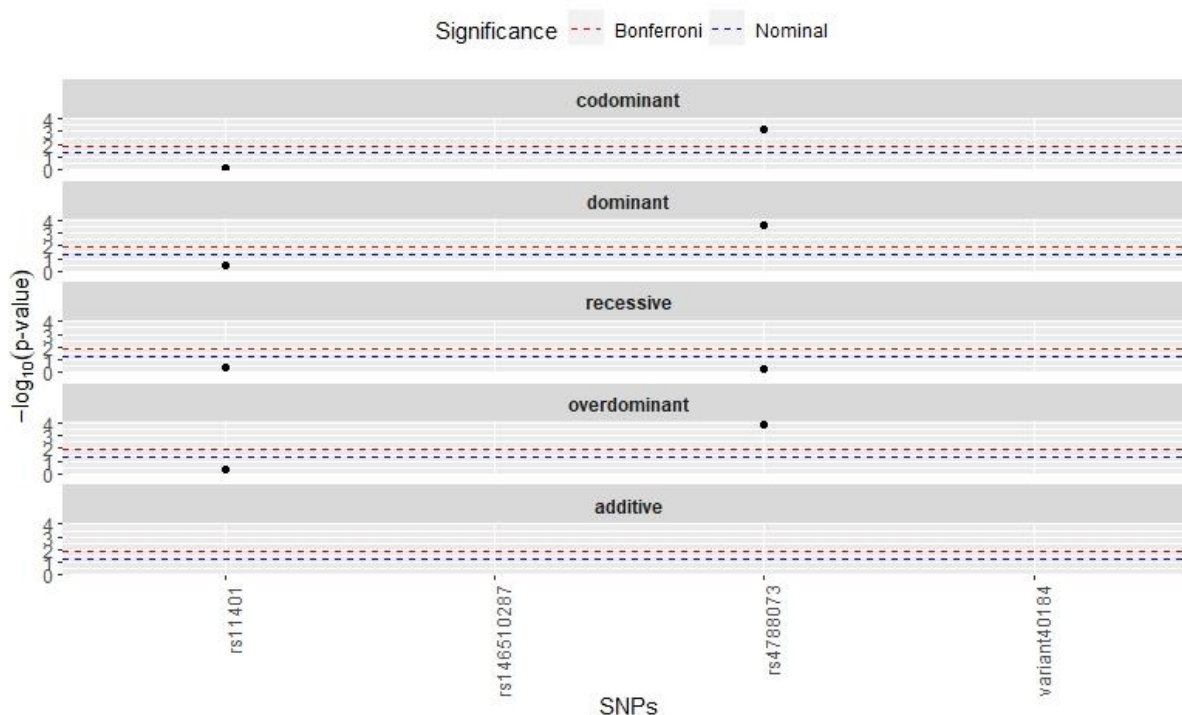
Z uwagi na to , że na wartości BMI wpływa wiek oraz płeć wykonano analizę z dostosowaniem do tych parametrów. Tabela 35 przedstawia wyniki:

Model	Niedowaga (N)	%	Otyłość(N)	%	OR	Lower	Upper	P-value	AIC
Dominujący	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T/T	63	37,3	182	30,7	1	-	-	0,00027	749,6
C/T-C/C	106	62,7	410	69,3	1,36	0,94	1,98		
Recesywny	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T/T-C/T	132	78,1	477	80,6	1	-	-	0,555	762,5
C/C	37	21,9	115	19,4	0,87	0,56	1,35		
Przewagi heterozygoty	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T/T-C/C	100	59,2	297	50,2	1	-	-	0,00012	748,2
C/T	69	40,8	295	49,8	1,45	1,01	2,08		
Log-Addytywny	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,1,2	169	22,2	592	77,8	1,1	0,85	1,41	0,319	762,9

OR – Iloraz Szans , Lower – dolny przedział ufności, Upper – górny przedział ufności, P-value – istotność statystyczna, AIC - Kryterium informacyjne Akaikiego.

Tabela 35. Szczegółowa analiza RS4788073 i wybranych modeli genetycznych z dostosowaniem do płci i wieku dla grupy badanych z niedowagą i otyłością.

Po zastosowaniu korekty względem płci i wieku, można zauważyć znaczące zmiany p.value przy modelu przewagi heterozygoty i dominującym. W przypadku modelu dominującego w grupie z niedowagą genotyp TT posiadało 37.3%, a genotyp CT/CC 62.7%. W grupie osób z otyłością 30.7% osób miało genotyp TT, a 69.3% osób miało genotyp CT/CC. Model przewagi heterozygoty również nadal jest istotny statystycznie. Średnia wartość BMI dla genotypu TT osiągnęła najniższy wynik. Przemawia to za tym, że w przypadku RS4788073 genotyp TT może predysponować do niedowagi w populacji Polskiej, a co za tym idzie działa ochronnie względem otyłości. Potwierdzone to zostało również w poprzedniej analizie w porównaniu do grupy z wagą normalną i niedowagą. Uzyskane wyniki przeszły również korektę Bonferroniego, co możemy zaobserwować na Rycinie 14:



Rycina 14. Zestawienie otrzymanych wyników analizy RS4788073.

Następnie wykonano analizę pomiędzy grupą badanych z wagą normalną i nadwagą. Wyniki przedstawia Tabela 36:

SNP	Komentarz	Model Dominujący	Model Recesywny	Model Przewagi heterozygoty	Model Log-addytywny
rs146510287	Monomorficzny	-	-	-	-
rs4788073	-	0.97	0.137	0.239	0.428
variant40184	Monomorficzny	-	-	-	-
rs11401	-	0.336	0.015	0.879	0.115

Tabela 36. Analiza genu CCDC101 i grupy z wagą prawidłową i nadwagą.

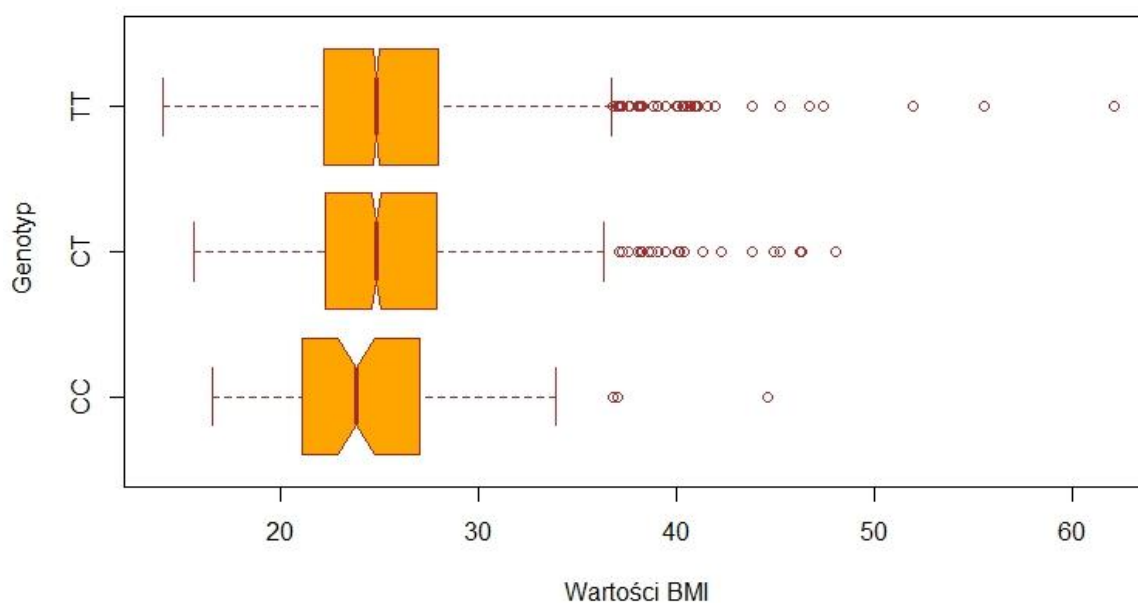
Powyższa analiza wykazała, że RS11401 osiągnął istotność statystyczną przy wyborze modelu recesywnego ($P=0.015$). Reszta badanych SNP'ów nie osiągnęła progu istotności statystycznej.

Następnie wykonano szczegółową analizę RS11401 który osiągnął istotność statystyczną oraz obliczono średnią wartość BMI i odchylenie standardowe dla poszczególnych genotypów.. Wyniki przedstawia Tabela 37 oraz Rycina 15:

Model	Waga Normalna (N)	%	Nadwaga (N)	%	OR	Lower	Upper	P-value	AIC
Dominujący	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T/T	1247	65,2	903	66,8	1	-	-	-	-
C/T-C/C	665	34,8	448	33,2	0,93	0,8	1,08	0,336	4429,6
Recesywny	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T/T-C/T	1849	96,7	1325	98,1	1	-	-	-	-
C/C	63	3,3	26	1,9	0,58	0,36	0,91	0,015	4424,7
Przewagi heterozygoty	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T/T-C/C	1310	68,5	929	68,8	1	-	-	-	4430,5
C/T	602	31,5	422	31,2	0,99	0,85	1,15	0,879	-
Log-Addytywny	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,1,2	1912	58,6	1351	41,4	0,9	0,79	1,03	0,1157575	4428,1

OR – Iloraz Szans , Lower – dolny przedział ufności, Upper – górny przedział ufności, P-value – istotność statystyczna, AIC - Kryterium informacyjne Akaikiego.

Tabela 37. Szczegółowa analiza RS11401 i wybranych modeli genetycznych dla grupy badanych z wagą prawidłową i nadwagą.



Rycina 15. Boxplot dla wartości BMI dla RS11401.

W modelu recesywnym w grupie z wagą normalną genotyp TT/TC miało 65.2%, a genotyp CC miało 3.3% osób. W grupie z nadwagą genotyp TT/TC miało 66.8%, a genotyp CC miało 1.9%. Za poprawnością wyboru recesywnego przemawia AIC, które ma najmniejszą wartość, właśnie przy tym modelu. Średnia wartość BMI dla genotypu TT wynosiła 25.35 przy odchyleniu standardowym 4.6, dla genotypu CC wynosiła 24.58 przy odchyleniu standardowym 4.6, a dla genotypu CT wynosiła 25.43 przy odchyleniu standardowym 4.6.

Z uwagi na to, że na wartości BMI wpływa wiek oraz płeć wykonano analizę z dostosowaniem do tych parametrów. Tabela 38 przedstawia wyniki:

Model	Waga Normalna (N)	%	Nadwaga (N)	%	OR	Lower	Upper	P-value	AIC
Dominujący	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T/T	1247	65,2	903	66,8	1	-	-	0,214	4339
C/T-C/C	665	34,8	448	33,2	0,91	0,78	1,06		
Recesywny	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T/T-C/T	1849	96,7	1325	98,1	1	-	-	0,017	4334,9
C/C	63	3,3	26	1,9	0,58	0,36	0,92		
Przewagi heterozygoty	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T/T-C/C	1310	68,5	929	68,8	1	-	-	0,654	4340,3
C/T	602	31,5	422	31,2	0,97	0,83	1,12		
Log-Addytywny	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,1,2	1912	58,6	1351	41,4	0,88	0,77	1,01	0,07	4337,3

OR – Iloraz Szans, Lower – dolny przedział ufności, Upper – górny przedział ufności, P-value – istotność statystyczna, AIC - Kryterium informacyjne Akaikiego.

Tabela 38. Szczegółowa analiza RS11401 i wybranych modeli genetycznych z dostosowaniem do płci i wieku dla grupy badanych z wagą prawidłową i nadwagą.

Po zastosowaniu korekty względem płci i wieku, można zauważyć niewielkie podwyższenie p.value do 0.017 przy modelu recesywnym. Również średnia wartość BMI genotypu CC osiągnęła najniższą wartość. Przemawia to za tym, że w przypadku RS11401 model recesywny oraz genotyp CC może działać ochronnie w stosunku do nadwagi w populacji Polskiej.

3.6 Analiza genu APOB48R i BMI.

SNP	Allel Dominujący /Recesywny	HWE	Brakujące	Komentarz	Model Dominujący	Model Recesywny	Model Przewagi heterozygoty	Model Log-addytywny	Model Dominujący Test Cochran	Model Dominujący Test Fisher	Model Recesywny Test Cochran	Model Recesywny Test Fisher	Model Dominujący Regresja liniowa	Model Dominujący Regresja logistyczna	Model Recesywny Regresja liniowa	Model Recesywny Regresja logistyczna
rs28576169	A	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs200346089	G/A	100	1	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs140393803	G	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs142080760	T	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs151136790	A/G	99	0.382	-	0.957	0.071	0.808	0.894	0.957	0.236	0.071	0.185	0.769	0.769	0.769	0.769
rs73533478	A	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs61738751	G	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs199677239	C	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs200832612	G/A	99.9	1	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs201825043	C	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
exm1229606	C	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs112010846	C	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs61753940	A/G	100	1	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs201730712	A/G	99.7	1	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs200288763	C	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs201232528	G	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs40832	C	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs113343275	A	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs199840321	A	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs201246198	C	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs199615243	G	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs200890256	T	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs201894432	C	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 39. Analiza genu APOB48R i BMI.

Wykonano analizę statystyczną genu APOB48R (23SNP) i BMI. Po wykonaniu testów statystycznych modelu genetycznego i BMI, nie osiągnięto progu istotności statystycznej.

Następnie wykonano analizę pomiędzy grupą badanych z wagą prawidłową i otyłością. Wyniki przedstawia Tabela 40:

SNP	Komentarz	Model Dominujący	Model Recesywny	Model Przewagi heterozygoty	Model Log-addytywny
rs28576169	Monomorficzny	-	-	-	-
rs200346089	Monomorficzny	-	-	-	-
rs140393803	Monomorficzny	-	-	-	-
rs142080760	Monomorficzny	-	-	-	-
rs151136790	-	0.403	0.233	0.543	0.181
rs73533478	Monomorficzny	-	-	-	-
rs61738751	Monomorficzny	-	-	-	-
rs199677239	Monomorficzny	-	-	-	-
rs200832612	Monomorficzny	-	-	-	-
rs201825043	Monomorficzny	-	-	-	-
exm1229606	Monomorficzny	-	-	-	-
rs112010846	Monomorficzny	-	-	-	-
rs61753940	Monomorficzny	-	-	-	-
rs201730712	Monomorficzny	-	-	-	-
rs200288763	Monomorficzny	-	-	-	-
rs201232528	Monomorficzny	-	-	-	-
rs40832	Monomorficzny	-	-	-	-
rs113343275	Monomorficzny	-	-	-	-
rs199840321	Monomorficzny	-	-	-	-
rs201246198	Monomorficzny	-	-	-	-
rs199615243	Monomorficzny	-	-	-	-
rs200890256	Monomorficzny	-	-	-	-
rs201894432	Monomorficzny	-	-	-	-

Tabela 40. Analiza genu APOB48R i grupy z wagą prawidłową i otyłością.

Powyższe badanie, wykazało, że żaden SNP nie osiągnął progu istotności statystycznej, zatem z tej analizy nie możemy wywnioskować, że jakikolwiek RS predysponuje do wagi prawidłowej lub otyłości, gdy porównuje się te dwie grupy.

Następnie wykonano analizę pomiędzy grupą badanych z wagą normalną i niedowagą. Wszystkie RS są monomorficzne, zatem nie można było wykonać żadnego testu statystycznego.

Następnie wykonano analizę pomiędzy grupą badanych z niedowagą i otyłością. Wyniki przedstawia Tabela 41:

SNP	Komentarz	Model Dominujący	Model Recesywny	Model Przewagi heterozygoty	Model Log-addytywny
rs28576169	Monomorficzny	-	-	-	-
rs200346089	Monomorficzny	-	-	-	-
rs140393803	Monomorficzny	-	-	-	-
rs142080760	Monomorficzny	-	-	-	-
rs151136790	-	0.254	1	0.207	0.352
rs73533478	Monomorficzny	-	-	-	-
rs61738751	Monomorficzny	-	-	-	-
rs199677239	Monomorficzny	-	-	-	-
rs200832612	Monomorficzny	-	-	-	-
rs201825043	Monomorficzny	-	-	-	-
exm1229606	Monomorficzny	-	-	-	-
rs112010846	Monomorficzny	-	-	-	-
rs61753940	Monomorficzny	-	-	-	-
rs201730712	Monomorficzny	-	-	-	-
rs200288763	Monomorficzny	-	-	-	-
rs201232528	Monomorficzny	-	-	-	-
rs40832	Monomorficzny	-	-	-	-
rs113343275	Monomorficzny	-	-	-	-
rs199840321	Monomorficzny	-	-	-	-
rs201246198	Monomorficzny	-	-	-	-
rs199615243	Monomorficzny	-	-	-	-
rs200890256	Monomorficzny	-	-	-	-
rs201894432	Monomorficzny	-	-	-	-

Tabela 41. Analiza genu APOB48R i grupy z niedowagą i otyłością.

Powyższe badanie, wykazało, że żaden SNP nie osiągnął progu istotności statystycznej, zatem z tej analizy nie możemy wywnioskować, że jakkolwiek RS predysponuje do niedowagi lub otyłości, gdy porównuje się te dwie grupy.

Następnie wykonano analizę pomiędzy grupą badanych z wagą normalną i nadwagą. Wszystkie RS są monomorficzne, zatem nie można było wykonać żadnego testu statystycznego.

3.7 Analiza genu SPNS1 i BMI.

SNP	Allel Dominujący/ Recesywny	HWE	Brakujące	Komentarz	Model Dominujący	Model Recesywny	Model Przewagi heterozygoty	Model Log-addytywny	Model Dominujący Test Cochran	Model Recesywny Test Fisher	Model Recesywny Test Cochran	Model Dominujący Regresja liniowa	Model Dominujący Regresja logistyczna	Model Recesywny Regresja liniowa	Model Recesywny Regresja logistyczna	
rs8045689	T/C	64.5	0.21	-	0.722	0.232	0.649	0.398	0.722	0.642	0.232	0.533	0.986	0.986	0.632	0.633
rs150373976	C	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs137908704	G/A	99.9	1	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs3922668	G/A	64.6	0.782	-	0.61	0.359	0.264	0.936	0.61	0.755	0.359	0.452	0.999	0.999	0.406	0.406
rs201586251	C	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs11859822	T/C	98.6	0.625	-	0.738	0.602	0.771	0.707	0.738	0.981	0.602	0.52	0.754	0.753	0.21	0.19
rs201680708	C/T	100	1	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs199695694	C/T	99.9	1	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs149610167	G/A	99.8	1	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs7140	A/C	64.1	0.581	-	0.883	0.276	0.554	0.519	0.883	0.591	0.276	0.592	0.842	0.842	0.749	0.75

Tabela 42. Analiza genu SPNS1 i BMI.

Wykonano analizę statystyczną genu SPNS1 (10 SNP) i BMI. Po wykonaniu testów statystycznych modelu genetycznego i BMI, nie osiągnięto progu istotności statystycznej.

Następnie wykonano analizę pomiędzy grupą badanych z wagą prawidłową i otyłością. Wyniki przedstawia Tabela 43:

SNP	Komentarz	Model Dominujący	Model Recesywny	Model Przewagi heterozygoty	Model Log-addytywny
rs8045689	-	0.782	0.28	0.318	0.741
rs150373976	Monomorficzny	-	-	-	-
rs137908704	Monomorficzny	-	-	-	-
rs3922668	-	0.394	0.041	0.025	0.688
rs201586251	Monomorficzny	-	-	-	-
rs11859822	Monomorficzny	-	-	-	-
rs201680708	Monomorficzny	-	-	-	-
rs199695694	Monomorficzny	-	-	-	-
rs149610167	Monomorficzny	-	-	-	-
rs7140	-	0.782	0.28	0.318	0.741

Tabela 43. Analiza genu SPNS1 i grupy z wagą prawidłową i otyłością.

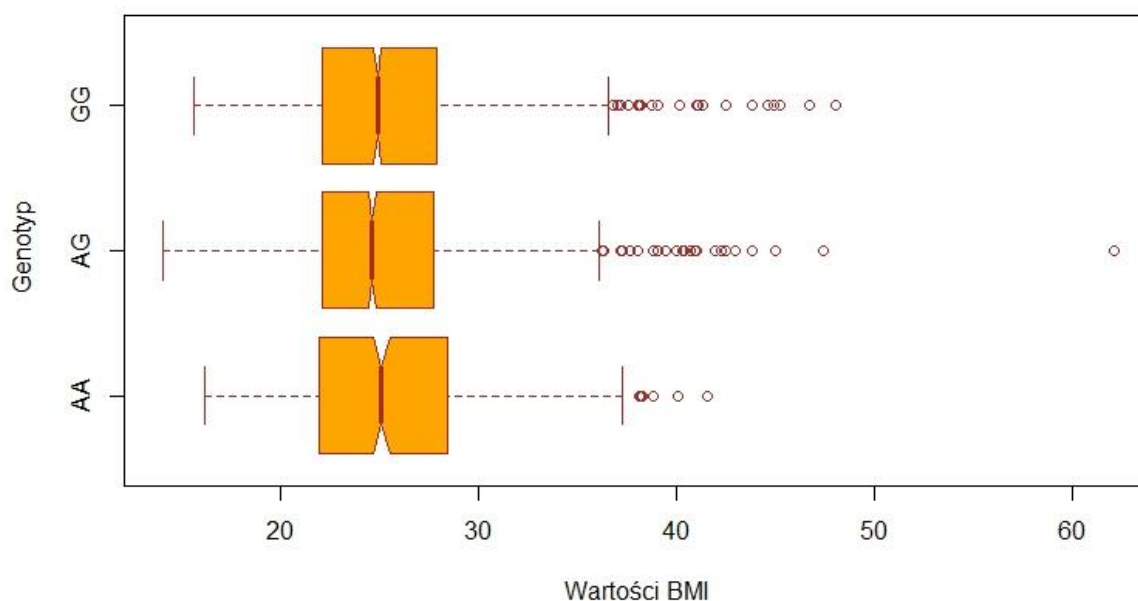
Powyzsza analiza wykazala, ze RS3922668 osiagnal istotnosc statystyczna przy wyborze modelu recesywnego i przewagi heterozygoty(P= 0. 041, P=0.025). Reszta badanych SNP'ow nie osiagnela progu istotnosc statystycznej.

Nastepnie wykonano szczegolowa analize RS3922668 ktory osiagnal istotnosc statystyczna oraz obliczono srednia wartosc BMI i odchylenie standardowe dla poszczegolnych genotypow. Wyniki przedstawia Tabela 44 i Rycina 16:

Model	Waga Normalna (N)	%	Otyłość(N)	%	OR	Lower	Upper	P-value	AIC
Dominujący	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G/G	804	40,6	258	42,6	1	-	-	0,394	2818,7
A/G-A/A	1175	59,4	348	57,4	0,92	0,77	1,11		
Recesywny	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G/G-A/G	1742	88	514	84,8	1	-	-	0,041	2815,3
A/A	237	12	92	15,2	1,32	1,01	1,71		
Przewagi heterozygoty	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G/G-A/A	1041	52,6	350	57,8	1	-	-	0,025	2814,5
A/G	938	47,4	256	42,2	0,81	0,68	0,98		
Log-Addytywny	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,1,2	1979	76,6	606	23,4	1,03	0,9	1,18	0,688	2819,3

OR – Iloraz Szans , Lower – dolny przedział ufności, Upper – górny przedział ufności, P-value – istotność statystyczna, AIC - Kryterium informacyjne Akaikiego.

Tabela 44. Szczegółowa analiza RS3922668 i wybranych modeli genetycznych dla grupy z wagą normalną i otyłością.



Rycina 16. Boxplot dla wartości BMI dla RS3922668.

W modelu przewagi heterozygoty który osiągnął istotność statystyczną, 52.6% badanych z wagą normalną ma genotyp homozygoty GG/AA, a 47.4% badanych genotyp heterozygoty A/G. W grupie osób z otyłością 57.8 % ma genotyp homozygoty, a 42.2 % genotyp heterozygoty. W modelu recesywnym w grupie osób z prawidłową wagą genotyp GG/ AG ma 40.6%, a genotypy AA 12%. W grupie osób z otyłością genotyp GG/AG ma 42.6% , a genotyp AA 15.2%. Za poprawnością wyboru przewagi heterozygoty przemawia AIC, które ma

najmniejszą wartość, właśnie przy tym modelu. Średnia wartość BMI dla genotypu GG wynosiła 25.29 przy odchyleniu standardowym 4.5, dla genotypu AG wynosiła 25.24 przy odchyleniu standardowym 4.4, a dla genotypu AA wynosiła 25.5 przy odchyleniu standardowym 4.7

Z uwagi na to, że na wartości BMI wpływa wiek oraz płeć wykonano analizę z dostosowaniem do tych parametrów. Tabela 45 przedstawia wyniki:

Model	Waga Normalna (N)	%	Otyłość(N)	%	OR	Lower	Upper	P-value	AIC
Dominujący	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G/G	804	40,6	258	42,6	1	-	-	0,394	2800,6
A/G-A/A	1175	59,4	348	57,4	0,92	0,77	1,11		
Recesywny	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G/G-A/G	1742	88	514	84,8	1	-	-	0,052	2797,6
A/A	237	12	92	15,2	1,3	1	1,69		
Przewagi heterozygoty	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G/G-A/A	1041	52,6	350	57,8	1	-	-	0,03	2796,6
A/G	938	47,4	256	42,2	0,82	0,68	0,98		
Log-Addytywny	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,1,2	1979	76,6	606	23,4	1,02	0,9	1,17	0,725	2801,2

Tabela 45. Szczegółowa analiza RS3922668 i wybranych modeli genetycznych z dostosowaniem do płci i wieku dla grupy z wagą normalną i otyłością.

Po zastosowaniu korekty względem płci i wieku, można zauważyć obniżenie wartości p.value do 0.03 przy modelu przewagi heterozygoty. Mimo wszystko, wartości są nadal istotne statystycznie i przemawia to za tym, że w RS3922668 osoby będące homozygotami mogą mieć większe predyspozycje do otyłości niż heterozygoty. Potwierdza to również średnia wartość BMI dla genotypu AG, która jest najniższa.

Następnie wykonano analizę pomiędzy grupą badanych z wagą normalną i niedowagą. Wyniki przedstawia Tabela 46:

SNP	Komentarz	Model Dominujący	Model Recesywny	Model Przewagi heterozygoty	Model Log-addytywny
rs8045689	-	0.324	0.755	0.434	0.378
rs150373976	Monomorficzny	-	-	-	-
rs137908704	Monomorficzny	-	-	-	-
rs3922668	-	0.251	0.375	0.082	0.682
rs201586251	Monomorficzny	-	-	-	-
rs11859822	Monomorficzny	-	-	-	-
rs201680708	Monomorficzny	-	-	-	-
rs199695694	Monomorficzny	-	-	-	-
rs149610167	Monomorficzny	-	-	-	-
rs7140	-	0.407	0.755	0.532	0.444

Tabela 46. Analiza genu SPNS1 i grupy z wagą prawidłową i niedowagą.

Powyższe badanie, wykazało, że żaden SNP nie osiągnął progu istotności statystycznej, zatem z tej analizy nie możemy wywnioskować, że jakkolwiek RS predysponuje do wagi prawidłowej lub niedowagi, gdy porównuje się te dwie grupy.

Następnie wykonano analizę pomiędzy grupą badanych z niedowagą i otyłością. Wyniki przedstawia Tabela 47:

SNP	Komentarz	Model Dominujący	Model Recesywny	Model Przewagi heterozygoty	Model Log-addytywny
rs8045689	-	0.439	0.405	0.829	0.335
rs150373976	Monomorficzny	-	-	-	-
rs137908704	Monomorficzny	-	-	-	-
rs3922668	-	0.53	0.826	0.636	0.582
rs201586251	Monomorficzny	-	-	-	-
rs11859822	Monomorficzny	-	-	-	-
rs201680708	Monomorficzny	-	-	-	-
rs199695694	Monomorficzny	-	-	-	-
rs149610167	Monomorficzny	-	-	-	-
rs7140	-	0.53	0.405	0.945	0.391

Tabela 47. Analiza genu SPNS1 i grupy z niedowagą i otyłością.

Powyższe badanie, wykazało, że żaden SNP nie osiągnął progu istotności statystycznej, zatem z tej analizy nie możemy wywnioskować, że jakkolwiek RS predysponuje do niedowagi lub otyłości, gdy porównuje się te dwie grupy.

Następnie wykonano analizę pomiędzy grupą badanych z wagą normalną i nadwagą. Wyniki przedstawia Tabela 48:

SNP	Komentarz	Model Dominujący	Model Recesywny	Model Przewagi heterozygoty	Model Log-addytywny
rs8045689	-	0.736	0.0513	0.097	0.472
rs150373976	Monomorficzny	-	-	-	-
rs137908704	Monomorficzny	-	-	-	-
rs3922668	-	0.256	0.484	0.113	0.6244
rs201586251	Monomorficzny	-	-	-	-
rs11859822	Monomorficzny	-	-	-	-
rs201680708	Monomorficzny	-	-	-	-
rs199695694	Monomorficzny	-	-	-	-
rs149610167	Monomorficzny	-	-	-	-
rs7140	-	0.736	0.058	0.106	0.49

Tabela 48. Analiza genu SPNS1 i grupy z wagą prawidłową i nadwagą.

Powyższe badanie, wykazało, że żaden SNP nie osiągnął progu istotności statystycznej, zatem z tej analizy nie możemy wywnioskować, że jakkolwiek RS predysponuje do wagi prawidłowej lub nadwagi, gdy porównuje się te dwie grupy.

3.8 Analiza genu SULT1A1 i BMI.

SNP	Allel Dominujący/ Recesywny	HWE	Brakujące	Komentarz	Model Dominujący	Model Recesywny	Model Przewagi heterozygoty	Model Log-addytywny	Model Dominujący Test Cochran	Model Dominujący Test Fisher	Model Recesywny Test Cochran	Model Recesywny Test Fisher	Model Dominujący Regresja liniowa	Model Dominujący Regresja logistyczna	Model Recesywny Regresja liniowa	Model Recesywny Regresja logistyczna
rs1042157	G/A	54.8	6e-06	-	0.131	0.302	0.577	0.111	0.068	0.095	0.314	0.569	0.183	0.182	0.759	0.759
rs41278160	C/T	95.3	2.1e-05	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs1042014	G	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs200013410	T	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs115253552	C	100	-	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs114062355	G/T	100	1	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs35480621	G/A	100	1	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs79527462	C/G	100	1	Monomorficzny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rs1968752	G/T	56.5	0.53	-	0.265	0.115	0.848	0.104	0.154	0.373	0.066	0.279	0.299	0.2981	0.304	0.304
kgp5388595	G/T	52.9	0.192	-	0.169	0.201	0.863	0.103	0.198	0.361	0.165	0.385	0.209	0.209	0.373	0.372

Tabela 49. Analiza genu SULT1A1 i BMI.

Wykonano analizę statystyczną genu SULT1A1 (10 SNP) i BMI. Po wykonaniu testów statystycznych modelu genetycznego i BMI, nie osiągnięto progu istotności statystycznej.

Następnie wykonano analizę pomiędzy grupą badanych z wagą prawidłową i otyłością. Wyniki przedstawia Tabela 50:

SNP	Komentarz	Model Dominujący	Model Recesywny	Model Przewagi heterozygoty	Model Log-addytywny
rs1042157	-	0.071	0.189	0.58	0.051
rs41278160	Monomorficzny	-	-	-	-
rs1042014	Monomorficzny	-	-	-	-
rs200013410	Monomorficzny	-	-	-	-
rs115253552	Monomorficzny	-	-	-	-
rs114062355	Monomorficzny	-	-	-	-
rs35480621	Monomorficzny	-	-	-	-
rs79527462	Monomorficzny	-	-	-	-
rs1968752	-	0.225	0.179	0.941	0.116
kgp5388595	-	0.286	0.432	0.759	0.25

Tabela 50. Analiza genu SULT1A1 i grupy z wagą normalną i otyłością.

Powyższe badanie, wykazało, że żaden SNP nie osiągnął progu istotności statystycznej, zatem z tej analizy nie możemy wywnioskować, że jakkolwiek RS predysponuje do wagi prawidłowej lub otyłości, gdy porównuje się te dwie grupy.

Następnie wykonano analizę pomiędzy grupą badanych z wagą normalną i niedowagą. Wyniki przedstawia Tabela 51:

SNP	Komentarz	Model Dominujący	Model Recesywny	Model Przewagi heterozygoty	Model Log-addytywny
rs1042157	-	0.176	0.954	0.201	0.379
rs41278160	Monomorficzny	-	-	-	-
rs1042014	Monomorficzny	-	-	-	-
rs200013410	Monomorficzny	-	-	-	-
rs115253552	Monomorficzny	-	-	-	-
rs114062355	Monomorficzny	-	-	-	-
rs35480621	Monomorficzny	-	-	-	-
rs79527462	Monomorficzny	-	-	-	-
rs1968752	-	0.275	0.715	0.454	0.343
kgp5388595	-	0.217	0.72	0.403	0.307

Tabela 51. Analiza genu SULT1A1 i grupy z wagą prawidłową i niedowagą.

Powyższe badanie, wykazało, że żaden SNP nie osiągnął progu istotności statystycznej, zatem z tej analizy nie możemy wywnioskować, że jakkolwiek RS predysponuje do wagi prawidłowej lub niedowagi, gdy porównuje się te dwie grupy.

Następnie wykonano analizę pomiędzy grupą badanych z niedowagą i otyłością. Wyniki przedstawia Tabela 52:

SNP	Komentarz	Model Dominujący	Model Recesywny	Model Przewagi heterozygoty	Model Log-addytywny
rs1042157	-	0.439	0.405	0.829	0.335
rs41278160	Monomorficzny	-	-	-	-
rs1042014	Monomorficzny	-	-	-	-
rs200013410	-	0.53	0.826	0.636	0.582
rs115253552	Monomorficzny	-	-	-	-
rs114062355	Monomorficzny	-	-	-	-
rs35480621	Monomorficzny	-	-	-	-
rs79527462	Monomorficzny	-	-	-	-
rs1968752	Monomorficzny	-	-	-	-
kgp5388595	-	0.53	0.405	0.945	0.391

Tabela 52. Analiza genu SULT1A1 i grupy z niedowagą i otyłością.

Powyższe badanie, wykazało, że żaden SNP nie osiągnął progu istotności statystycznej, zatem z tej analizy nie możemy wywnioskować, że jakkolwiek RS predysponuje do niedowagi lub otyłości, gdy porównuje się te dwie grupy.

Następnie wykonano analizę pomiędzy grupą badanych z wagą normalną i nadwagą. Wyniki przedstawia Tabela 53:

SNP	Komentarz	Model Dominujący	Model Recesywny	Model Przewagi heterozygoty	Model Log-addytywny
rs1042157	-	0.715	0.953	0.777	0.782
rs41278160	Monomorficzny	-	-	-	-
rs1042014	Monomorficzny	-	-	-	-
rs200013410	Monomorficzny	-	-	-	-
rs115253552	Monomorficzny	-	-	-	-
rs114062355	Monomorficzny	-	-	-	-
rs35480621	Monomorficzny	-	-	-	-
rs79527462	Monomorficzny	-	-	-	-
rs1968752	-	0.961	0.108	0.23	0.351
kgp5388595	-	0.876	0.11	0.148	0.401

Tabela 53. Analiza genu SULT1A1 i grupy z wagą prawidłową i nadwagą.

Powyższe badanie, wykazało, że żaden SNP nie osiągnął progu istotności statystycznej, zatem z tej analizy nie możemy wywnioskować, że jakkolwiek RS predysponuje do wagi prawidłowej lub nadwagi, gdy porównuje się te dwie grupy.

4. Dyskusja

4.1 Analiza związku inwersji genetycznej 16p11.2 oraz genów leżących w obrębie z predyspozycją do wystąpienia otyłości i nadwagi.

4.1.1 Obszar inwersji chromosomu 16.

Po wykonaniu analizy na obszarze inwersji chromosomu 16 wykazano, że jedyna istotna różnica statystyczna przed korektą Bonfferoniego występuje w modelu recesywnym RS149299 ($p=0.043$) pomiędzy grupą osób z normalną wagą, a grupą osób z otyłością. Zarówno RS151179 ($p=0.55$) jak i RS151181 ($p=0.055$), które zostały wyznaczone na markery inwersji w poprzednim badaniu opisanym w pracy magisterskiej („A genetic sequence inversion on chromosome 16 in the Polish population.”), mają podobny wynik p .value co RS149299. Niestety obydwie nie przeszły progu istotności statycznej. Zważywszy jednak na bardzo bliskie wyniki wszystkich markerów inwersji, możemy wziąć wynik RS149299 jako odzwierciedlenie wpływu inwersji chromosomu 16 na otyłość w populacji Polskiej.

Możemy zaobserwować, że u osób otyłych, genotyp C/C występował częściej, niż u osób z wagą normalną. Po dokonaniu korekty względem płci i wieku, które również wpływają na zwiększoną wagę, wartość p .value zmalała, a więc zależność ta była bardziej widoczna. Zatem, istnieje prawdopodobieństwo że inwersja chromosomu 16 w populacji Polskiej predysponuje do otyłości podobnie jak w badaniu przeprowadzonym na populacji Estonii. [13]

4.1.2 Gen TUFM.

Gen TUFM (Ensembl:ENSG00000178952) koduje białko (Czynniki elongacyjne TU, UNIPROT:P49411), które bierze udział w translacji białek w mitochondriach. Mutacje w tym genie są związane z połączonym niedoborem fosforylacji oksydacyjnej skutkującym kwasicą mleczanową i śmiertelną encefalopatią. Pseudogen został zidentyfikowany na chromosomie 17. Wśród powiązanych z nim szlaków są również infekcja SARS-CoV-2 i translacja mitochondrialna. Adnotacje Gene Ontology związane z tym genem obejmują wiązanie RNA i aktywność GTPazy. [101] W badaniu przeprowadzonym przez J.R. Gonzaleza wykazano, że inwersja chromosomu 16 wpływa

na ekspresję genu TUFM, który reguluje bilans energetyczny, dlatego też ten gen może mieć związek z predyspozycją do otyłości. [13]

Po wykonaniu analizy statystycznej wykazano, że istotna różnica statystyczna występuje w modelu dominującym RS8061877. Jest ona istotna zarówno dla grup BMI jak i BMI jak zmiennej numerycznej. Średnia wartość BMI dla genotypu CC wyniosła 25.44, dla genotypu TC wyniosła 25.26, a dla genotypu TT wyniosła 25.0. Również wykazano istotność statystyczną gdy porównano grupę z wagą normalną i grupę z otyłością. W grupie z otyłością, więcej osób miało genotyp CC. Zatem, istnieje prawdopodobieństwo, że w przypadku RS8061877, który występuje w genie TUFM, model dominujący, a dokładnie genotyp CC może predysponować do otyłości w populacji Polskiej.

4.1.3 GEN SH2B1.

W przypadku genu SH2B1 (ENSG00000178188), nie można było przeprowadzić analizy, ponieważ wszystkie SNP'y były monomorficzne, a więc wszyscy badani mieli ten sam genotyp.

4.1.4 Gen CCDC101 (SGF29).

CCDC101, obecnie określany jako SGF29 (ENSG00000176476), wytwarza białko SAGA Complex Associated Factor 29 (Q96ES7). CCDC101 jest podjednostką 2 histonowych kompleksów acetylotransferazy: kompleksu zawierającego ADA2A (TADA2A; MIM 602276) (ATAC) i SPT3 (SUPT3H; MIM 602947)-TAF9 (MIM 600822)-GCN5 (KAT2A; MIM 602301)/PCAF (KAT2B; MIM 602303) kompleks acetylazy (STAGA). [21] Niestety na tą chwilę nie znaleziono powiązań tego genu z otyłością, jednakże uzyskane wyniki w tej pracy dają nam nowe światło na to, że gen ten może być z tym związany.

Po wykonaniu analizy statystycznej wykazano, że porównując grupę z wagą prawidłową i niedowagą, w modelu przewagi heterozygoty który osiągnął istotność statystyczną, 59.2% badanych z niedowagą miało genotyp TT/CC, a 40.8% badanych genotyp CT. W grupie osób z wagą prawidłową 49.9% miało genotyp TT/CC, a 50.1% genotyp CT. Średnia wartość BMI dla genotypu TT wynosiła 25.28, dla genotypu CC wynosiła 25.37, a dla genotypu CT wynosiła 25.41. Również taki sam wynik został osiągnięty w porównaniu grupy z niedowagą i otyłością. W przypadku tej analizy uzyskane wartości

p.value przeszły również pomyślnie korektę Bonferroniego. Przemawia to za tym, że w przypadku RS4788073 osoby, które są homozygotami mają większą predyspozycję do niedowagi niż w przypadku osób, które są heterozygotami.

W przypadku RS11401 w modelu recesywnym, który również osiągnął istotność statystyczną, w grupie z wagą normalną genotyp TT/TC miało 65.2%, a genotyp CC miało 3.3% osób. W grupie z nadwagą genotyp TT/TC miało 66.8%, a genotyp CC miało 1.9%. Średnia wartość BMI dla genotypu TT wynosiła 25.35, dla genotypu CC wynosiła 24.58, a dla genotypu CT wynosiła 25.43. Przemawia to za tym, że w przypadku RS11401 model recesywny oraz genotyp CC może działać ochronnie w stosunku do nadwagi w populacji Polskiej.

4.1.5 Gen APOB48R.

Gen APOB48R jest obecnie określany jako APOBR (ENSG00000184730).

W analizie tego genu nie wykazano żadnych istotnych różnic statystycznych.

4.1.6 Gen SPNS1.

Kolejny gen to SPNS1 (ENSG00000169682), który koduje białko (Spinster Homolog 1 (Q9H2V7)) związane z transportem sfingolipidów. Przewiduje się, że bierze udział w transporcie lipidów i transporcie przez błonowy. Również związany z utrzymaniem optymalnego pH w lizosomie. [19] Niestety na tą chwilę nie znaleziono powiązań tego genu z otyłością, jednakże uzyskane wyniki w tej pracy dają nam nowe światło na to, że gen ten może być z tym związany.

Po wykonaniu analizy statystycznej pomiędzy grupą o wadze prawidłowej, a grupą z otyłością, w modelu przewagi heterozygoty który osiągnął istotność statystyczną, 52.6% badanych z wagą normalną ma genotyp homozygoty GG/AA, a 47.4% badanych genotyp heterozygoty A/G. W grupie osób z otyłością 57.8 % ma genotyp homozygoty, a 42.2 % genotyp heterozygoty. Średnia wartość BMI dla genotypu GG wynosiła 25.29, dla genotypu AG wynosiła 25.24, a dla genotypu AA wynosiła 25.5. Przemawia to za tym, że w RS3922668 osoby będące homozygotami mogą mieć większe predyspozycje do otyłości niż heterozygoty. Potwierdza to również średnia wartość BMI dla genotypu AG, która jest najniższa.

4.1.7 Gen SULT1A1.

W analizie genu SULT1A1 (ENSG00000196502) nie wykazano żadnych istotnych różnic statystycznych.

4.2 Otyłość a genetyka.

Zmiany w środowisku niewątpliwie przyczyniły się do szybkiego wzrostu rozpowszechnienia otyłości. Co najważniejsze, istnieje silny „składnik” genetyczny leżący u podstaw dużej międzyosobniczej zmienności masy ciała, która determinuje reakcję ludzi na to „otyłe” środowisko. Badania bliźniacze, rodzinne i adopcyjne oszacowały dziedziczność otyłości na 40% do 70%. W rezultacie podejścia genetyczne można wykorzystać do scharakteryzowania leżących u podstaw mechanizmów fizjologicznych i molekularnych kontrolujących masę ciała. [102] Otyłość można rozważyć w dwóch szerokich kategoriach: tak zwana otyłość monogenowa, dziedziczona na wzór mendelowski, jest zazwyczaj rzadka, ma wczesny początek i jest ciężka, i obejmuje małe lub duże delecje chromosomalne lub defekty pojedynczego genu; i otyłości wielogenowej (znana również jako otyłość powszechna), która jest wynikiem setek polimorfizmów, z których każdy ma niewielki wpływ. Otyłość wielogenowa podlega wzorcowi dziedziczności, który jest podobny do innych złożonych cech i chorób. Chociaż często uważa się, że są to dwie odrębne formy, badania genów nad otyłością monogenową i poligenową zbiegły się w tym, co wydaje się być zasadniczo podobną podstawową biologią. W szczególności ośrodkowy układ nerwowy i szlaki neuronalne, które kontrolują hedoniczne aspekty przyjmowania pokarmu, okazały się głównymi czynnikami wpływającymi na masę ciała zarówno w przypadku otyłości monogenowej, jak i wielogenowej. Co więcej, wczesne dowody wskazują, że na ekspresję mutacji powodujących otyłość monogenową może — przynajmniej częściowo — wpływać poligeniczna podatność danej osoby na otyłość. [103]

Podejścia stosowane do identyfikacji genów powiązanych z otyłością zależą od formy otyłości i technologii genotypowania dostępnej w danym czasie. Wczesne badania odkrywania genów dla monogenicznych postaci otyłości miały projekt skoncentrowany na przypadku pacjentów z ciężką otyłością wraz z członkami ich rodzin dotkniętych chorobą i zdrowych, zbadanych pod kątem potencjalnych mutacji przyczynowych powodujących zaburzenia genów za pomocą sekwencjonowania Sangera. Natomiast zmienność genetyczna związana z powszechnymi formami otyłości została zidentyfikowana w badaniach populacyjnych na dużą skalę, albo przy użyciu projektu kontroli przypadku, albo ciągłych cech, takich jak BMI. Odkrycie genów dla obu form

otyłości było początkowo oparte na hipotezach; to znaczy ograniczone do zestawu genów kandydujących, które, jak sugerują dowody, odgrywają rolę w regulacji masy ciała.

Większość monogenowych mutacji otyłości zidentyfikowano u pacjentów z otyłością ciężką i o wczesnym początku (<10 lat). Dodatkowo, ponieważ otyłość monogenowa często wykazuje recesywny wzór dziedziczenia [104], pokrewieństwo w populacjach jeszcze bardziej zwiększyło szansę na zidentyfikowanie mutacji, ze względu na większe szanse na homozygotyczność szkodliwych mutacji [105]. Na przykład badania wykazały, że mutacje w genach kodujących leptynę, LEPR i MC4R wyjaśniają 30% przypadków ciężkiej otyłości u dzieci ze spokrewnionej populacji pakistańskiej [106]. Inne geny, które są zaangażowane w ciężką i wczesną otyłość to między innymi: ADCY3 na chromosomie 2, AGRP na chromosomie 16, KSR2 na chromosomie 12, SH2B1 na chromosomie 16 czy SIM1 na chromosomie 6. [102]

Odkrycie genów wpływających na otyłość wielogenową, która jest powszechna w populacji ogólnej, rozpoczęło się powoli od badań genów kandydujących i badań powiązań w całym genomie. Podejście do genów kandydujących zostało po raz pierwszy zastosowane w połowie lat 90. Typowe warianty takich genów kandydujących przetestowano pod kątem związku z ryzykiem otyłości, BMI lub innymi cechami składu ciała. W ciągu następnych 15 lat setki genów badano jako kandydatów, ale warianty tylko w sześciu (ADRB3, BDNF, CNR1, MC4R 38, PCSK1 i PPARG 40 [102]) wykazały powtarzalny związek z wynikami otyłości. Podejście polegające na powiązaniu całego genomu pojawiło się w tej dziedzinie pod koniec lat 90. Badania powiązań całego genomu opierają się na pokrewieństwie osobników i sprawdzają, czy określone regiony chromosomów współsegregują z chorobą lub cechą przez pokolenia. Mimo że w ponad 80 badaniach powiązań obejmujących cały genom zidentyfikowano >300 loci chromosomalnych z sugestywnymi dowodami powiązania z cechami otyłości, niewiele loci zostało zreplikowanych i żadne nie zostało z powodzeniem zmapowane w celu wskazania genu lub genów przyczynowych [107]. Ostatecznie badania powiązań genów kandydujących i całego genomu, ograniczone przez małe rozmiary próbek, rzadkie pokrycie zmienności genetycznej w całym genomie i brak replikacji, miały jedynie marginalny wpływ na postęp w odkrywaniu genów powodujących powszechne skutki otyłości. Jednak tempo odkrywania genów dla powszechnych chorób przyspieszyło wraz z pojawieniem się badań asocjacyjnych całego genomu (GWAS). Pierwsze GWAS dla cech otyłości zostały opublikowane w 2007 roku i zidentyfikowały klaster powszechnych

wariantów w pierwszym intronie genu FTO , który został przekonująco powiązany z BMI. [108]

Pomimo trudności w walidacji przyczynowych mutacji i wariantów, badania genetyczne zarówno rzadkiej, jak i powszechnej otyłości w ciągu ostatnich dwóch dekad ujawniły dwa zaskakująco przekonujące, nadrzędne komunikaty biologiczne: po pierwsze, szlak leptyna-melanokortyna jest kluczowym obwodem kontroli apetytu [104], a po drugie, geny, które są albo wzbogacone, albo ulegają ekspresji wyłącznie w mózgu i OUN, odgrywają główną rolę w otyłości. [109]

Ponieważ odkrywanych jest coraz więcej wariantów powszechnej otyłości, rośnie oczekiwanie, że informacja genetyczna zostanie wkrótce wykorzystana do identyfikacji osób zagrożonych otyłością. Znajomość podatności genetycznej danej osoby pozwoliłaby na dokładniejsze przewidywanie, kto jest zagrożony przybraniem na wadze i dałaby możliwość wcześniejszej interwencji, aby skuteczniej zapobiegać otyłości. Również wyniki uzyskane w tym badaniu potwierdzają, że genetyka ma związek z otyłością i jest wiele genów, które mogą predysponować do zwiększonej wagi.

4.3 Chromosom 16 i choroby.

4.3.1 Ostra Białaczka Szpikowa.

Mutacja na chromosomie 16 nie tylko jest związana z predyspozycją do otyłości. Również inne mutacje na tym chromosomie mogą predysponować do wystąpienia poważnych chorób, dlatego warto je również poznać szerzej. Jedną z nich jest ostra białaczka szpikowa (AML), która jest najczęstszym typem białaczki u dorosłych, ale nadal charakteryzuje się najniższym wskaźnikiem przeżywalności ze wszystkich białaczek. Choć postępy w leczeniu AML doprowadziły do znacznej poprawy wyników u młodszych pacjentów, rokowanie u osób starszych, które stanowią większość nowych przypadków, pozostaje złe. Choć zapadalność na ostre białaczki stanowi <3% wszystkich nowotworów, choroby te stanowią główną przyczynę zgonów z powodu nowotworów u dzieci i osób w wieku <39 lat. AML stanowi około 25% wszystkich białaczek u dorosłych w świecie zachodnim, a zatem jest najczęstszą postacią białaczki. [110] Częstość występowania AML wzrasta wraz z wiekiem, od ~1,3 na 100 000 osób w wieku poniżej 65 lat do 12,2 przypadków na 100 000 osób w wieku powyżej 65 lat. Nawet przy obecnym leczeniu aż 70% pacjentów w wieku 65 lat lub starszych umrze z powodu swojej choroby w ciągu 1 roku od postawienia diagnozy. [111]

Wśród dzieci zaburzenia genetyczne i konstytucyjne defekty genetyczne są ważnymi czynnikami ryzyka związanymi z ostrą białaczką szpikową. Dzieci z zespołem Downa mają od 10 do 20 razy większe prawdopodobieństwo zachorowania na AML. [112] Inne choroby dziedziczne związane z AML obejmują zespół Klinefeltera, zespół Li-Fraumeni [113], 41 niedokrwistość Fanconiego i nerwiakowłókniakowatość. [114] Niedawne badanie wykazało, że inne czynniki ryzyka rozwoju AML u dzieci obejmują rasę/pochodzenie etniczne, wiek ojca w chwili poczęcia oraz czas, jaki upłynął od ostatniego żywego urodzenia matki. [115]

Ostra białaczka szpikowa u dorosłych pojawia się jako de novo nowotwór złośliwy u wcześniej zdrowych osób. Niezależnie od etiologii, patogeneza AML obejmuje nieprawidłową proliferację i różnicowanie klonalnej populacji mieloidalnych komórek macierzystych. Dobrze scharakteryzowane translokacje chromosomalne, takie jak t(8:21) w czynniku wiążącym rdzeń AML (CBF-AML) lub t(15:17) w ostrej białaczce promielocytowej (APL) powodują powstawanie białek chimerycznych (RUNX1-

RUNX1T1 i odpowiednio PML-RARA), które zmieniają normalny proces dojrzewania mieloidalnych komórek prekursorowych. [116] Oprócz dużych rearanżacji chromosomalnych, w rozwój AML zaangażowano również zmiany molekularne. W rzeczywistości mutacje genetyczne są identyfikowane w ponad 97% przypadków. [117] Pomimo znacznych postępów, jeszcze wiele pozostaje do odkrycia. Jak sugeruje „model dwóch uderzeń”, patogenezę i zachowanie AML zależy w dużej mierze od interakcji między różnymi zmianami somatycznymi i rearanżacjami chromosomów. Zatem mutacja c-KIT została powiązana z t(8;21) lub inv(16), a jej obecność ma istotne implikacje dotyczące rokowania.

Większość objawów klinicznych AML odzwierciedla nagromadzenie złośliwych, słabo zróżnicowanych komórek mieloidalnych w szpiku kostnym, krwi obwodowej i rzadko w innych narządach. U większości pacjentów występuje połączenie leukocytozy i objawów niewydolności szpiku kostnego, takich jak niedokrwistość i małopłytkowość. Zmęczenie, anoreksja i utrata masy ciała to częste dolegliwości; zazwyczaj nie obserwuje się limfadenopatii i organomegalii. Przy nieleczonej chorobie, śmierć zwykle następuje w ciągu kilku miesięcy od diagnozy w wyniku infekcji lub krwawienia. Rozpoznanie ostrej białaczki ustala się na podstawie obecności 20% lub więcej blastów w szpiku kostnym lub krwi obwodowej. [118] Rozpoznanie AML można również ustalić na podstawie obecności nacieku tkanki pozaszpikowej lub udokumentowanego t(8;21), inv(16) lub t(15;17) w odpowiednich warunkach klinicznych, niezależnie od odsetka blastów. [119]

Nieprawidłowości chromosomu 16 występują w około 5–8% przypadków ostrej białaczki szpikowej (AML). AML z inv(16)(p13.1q22) lub t(16;16)(p13.1;q22) wiąże się z wysokim odsetkiem całkowitej remisji (CR) i korzystnym całkowitym przeżyciem (OS) w przypadku leczenia wysokimi dawkę cytarabiny. W punktach przerwania inwersji odnotowano delecję 3' CBFβ, ale większość z nich zbadano za pomocą analiz chromosomów i fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH). Charakterystyka genomowa takich delecji pozostaje w dużej mierze niezdefiniowana, co utrudnia dalsze zrozumienie klinicznego znaczenia delecji. [120]

4.3.2 Delecja 16p11.2.

Delecja chromosomu 16 w regionie 16p11.2 jest najczęściej mutacją de novo i jest dziedziczona u około 7% probantów. Jest związana z zaburzeniami neuropsychiatrycznymi, takimi jak zaburzenia ze spektrum autyzmu i schizofrenia. [121]

Większość, jeśli nie wszystkie osoby z powtarzającą się delecją 16p11.2 doświadczają pewnego stopnia opóźnienia rozwojowego, chociaż nasilenie jest różne. Zaburzenie koordynacji rozwojowej (motorycznej) jest jedną z najczęstszych diagnoz u osób z nawracającą delecją. [122] Większość osób dotkniętych chorobą nie ma niepełnosprawności intelektualnej (zdefiniowanej jako IQ <70), ale wiele z nich ma poniżej średniej zdolności poznawcze i trudności w uczeniu się zarówno w domenach werbalnych, jak i niewerbalnych. [122]

Osoby z nawracającą delecją 16p11.2 są bardziej narażone na diagnozy psychiatryczne, przy czym większość osób z delecją ma co najmniej jedną diagnozę psychiatryczną. [121] Zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ADHD) jest powszechny i zgłaszany u około 35% osób z delecją. Inne diagnozy psychiatryczne, takie jak zaburzenia lękowe, zaburzenie obsesyjno-kompulsyjne (OCD), zaburzenie opozycyjno-buntownicze, zaburzenie zachowania i schizofrenia, są obecne u osób z nawracającą delecją 16p11.2, ale nie zgłaszano, że przekraczają kontrolę populacji.

Większość dzieci (~80%) z nawracającą delecją ma motoryczne zaburzenie mowy, takie jak dziecięca apraksja mowy (CAS) i dyszartria. [123] CAS jest szczególnie rozpowszechniony (występuje u 77% dzieci dotkniętych chorobą) i często współwystępuje z innymi zaburzeniami dźwięku mowy, takimi jak zaburzenia artykulacji i fonologiczne. Większość zaburzeń motorycznych mowy jest klasyfikowana jako łagodne do umiarkowanych, ale cechy CAS mogą utrzymywać się w wieku dorosłym. [123]

Nawracająca delecja 16p11.2 jest czynnikiem predysponującym do nadwagi i otyłości. Kilka badań pokazuje, że otyłość jest cechą nawracającej delecji, przy czym częstość występowania nadwagi i otyłości jest wyższa niż w populacji ogólnej. Otyłość u osób z delecją chromosomu 16 na ogół pojawia się w dzieciństwie. [124]

Na podstawie aktualnych doniesień literaturowych autyzm rozpoznaje się u około 20%-25% osób z delecją 16p11.2. Chociaż nie wszystkie osoby z nawracającą delecją spełniają kryteria diagnostyczne autyzmu, prawie wszystkie mają pewne cechy behawioralne wspólne z tą chorobą w tym naleganie na identyczność, ograniczony zakres zainteresowań, powtarzające się zachowania i problemy z komunikacją społeczną. [122]

4.3.3 Duplikacja 16p.11.2

U osób z duplikacją 16p11.2 mogą występować opóźnienie rozwojowe i niepełnosprawność intelektualna. [125] Około jedna trzecia dzieci z tym schorzeniem ma opóźnienia w rozwijaniu umiejętności fizycznych, takich jak siedzenie, raczkowanie lub chodzenie. Średnie IQ osób dotkniętych chorobą jest o około 26 punktów niższe niż ich rodziców bez duplikacji. Około 80 procent osób z duplikacją 16p11.2 ma problemy związane z mową lub językiem. Może to mieć wpływ zarówno na ekspresywne umiejętności językowe (słownictwo i wytwarzanie mowy), jak i receptywne umiejętności językowe (zdolność rozumienia mowy). [126] [127]

Jednym z najczęstszych problemów behawioralnych związanych z tą zmianą chromosomalną jest zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ADHD). Zaburzenia ze spektrum autyzmu, które wpływają na komunikację i umiejętności społeczne, są diagnozowane u około jednej na pięć osób z duplikatem 16p11.2. Osoby dotknięte chorobą mają również zwiększone ryzyko problemów ze zdrowiem psychicznym, w tym schizofrenii, lęku i depresji. Nawracające napady są możliwe w tym stanie, chociaż nie występują u większości dotkniętych osób. [128] [129] [130]

Możemy zatem zauważyć, że zarówno delecja jak i duplikacja 16p.11.2 wpływają głównie na zaburzenia psychiatryczne jak i neurologiczne i są ważnym czynnikiem predysponującym. W przypadku delecji 16p.11.2 wpływa ona również na otyłość i nadwagę. Delecja ta jest zaraz obok badanej inwersji, i obydwie mutacje mogą predysponować do otyłości i nadwagi.

4.4 Inne efekty związane z inwersją chromosomu.

Inwersja chromosomu 16 nie jest jedyną inwersją, która może predysponować do jednostki chorobowej. Wydaje się, że wiele inwersji wykrytych w ludzkim kariotypie nie ma żadnych efektów fenotypowych o znaczeniu klinicznym. Może być tak w przypadku inwersji perycentrycznych w chromosomach 1, 2, 3, 5, 9, 10 i 16, które odwracają głównie sekwencje heterochromatyczne [131] i które często obserwuje się w analizie cytogenetycznej. Należy zauważyć, że chromosomy 1, 9, 16 i chromosom Y zawierają znacznie więcej konstytutywnej heterochromatyny – albo bez genów, albo z genami w większości stłumionymi – niż inne chromosomy. Perycentryczna inwersja w chromosomie 9 wykazuje zmienne częstotliwości w różnych populacjach ludzkich: od 0,26% u Azjatów do 3,57% u osób z Afryki. [132]

Jednak nie wszystkie inwersje są nieszkodliwe, a niektóre choroby są czasami spowodowane odwróceniem sekwencji, głównie przez bezpośrednie zaburzenie genu lub zmianę jego ekspresji. Te inwersje pojawiają się de novo u pacjentów lub mutacje odziedziczone są ograniczone do danej rodziny i nie reprezentują odmian polimorficznych (tzn. nie występują u >1% populacji) w populacji ludzkiej [133]. Niemniej jednak mają one znaczenie kliniczne i mogą przyczynić się do identyfikacji genów leżących u podstaw rzadkich zaburzeń. [134] Ponadto kilka inwersji powoduje choroby genetyczne, takie jak hemofilia A i zespół Huntera (zaburzenie metaboliczne zwane także mukopolisacharydozą typu II). W hemofilii A inwersja jest generowana przez rekombinację między powtórzeniem 9,5 kbp w intronie 22 genu F8 i jedną z pozostałych dwóch kopii w odległości około 565 kbp na chromosomie X. [135] Ten gen, który koduje czynnik krzepnięcia VIII, jest zaburzony przez te inwersje u około 45% pacjentów z ciężką hemofilią A. Inna inwersja, około 140 kbp, która występuje również w genie F8, ale w intronie 1, jest odpowiedzialna za 4,8% hemofilii typu A. Oprócz przerwania genu ta druga inwersja generuje również transkrypty hybrydowe, które obejmują pierwszy ekson genu F8 i eksony z genu VBP1. [136] Dwa powyższe typy inwersji wykryto w rodzinnej hemofilii, w której mutacja została odziedziczona przez pacjentów płci męskiej od ich zdrowych matek oraz w pojedynczych przypadkach, gdy inwersja była de novo.

W zespole Huntera inwersja powoduje zmniejszenie ekspresji genu IDS sprzężonego z chromosomem X, który koduje 2-sulfatazę iduronianu i powoduje rekombinację z sekwencjami homologicznymi w sąsiednim pseudogenie (IDS2) u 13% pacjentów [137]. Podobnie w przypadku niektórych nowotworów inwersje, które zakłócają regiony kodujące lub tworzą geny fuzyjne, mogą być bezpośrednio związane z rokowaniem pacjenta. [138]

Jednym z głównych ograniczeń w badaniu efektów funkcjonalnych ludzkich inwersji polimorficznych jest brak informacji na temat genotypu. Jednakże, chociaż podstawowe mechanizmy molekularne pozostają niejasne, efekty fenotypowe zostały powiązane z dwiema orientacjami kilku ludzkich polimorfizmów inwersji. Najbardziej uderzającym i najlepiej zbadanym przypadkiem jest inwersja 17q21.31, która odwraca ~970 kbp pojedynczej sekwencji kopii zawierającej gen MAPT i utrzymuje dwa oddzielne haplotypy: H1 i H2. Haplotyp H1 został powiązany z kilkoma chorobami neurodegeneracyjnymi, w tym postępującym porażeniem nadjądrowym [139], zwyrodnieniem korowo-podstawnym [140], chorobą Alzheimera [141] i chorobą Parkinsona [142] prawdopodobnie związanymi z agregacją hiperfosforylowanego białka Tau (kodowanego przez MAPT gen) w ciałach komórek nerwowych. Z drugiej strony haplotyp H2 został również powiązany z kilkoma fenotypami, które mogą, ale nie muszą, być korzystne. Na przykład wiąże się to ze zwiększoną średnią szybkością rekombinacji u kobiet [12]. Kobiety z wysokimi wskaźnikami rekombinacji najwyraźniej mają więcej dzieci [143] i obie cechy zostały wykryte u kobiet nosicielek H2 w populacji islandzkiej. Podobnie inwersja 8p23.1, która jest najdłuższym polimorfizmem inwersji (około 4,5 Mbp) opisanym u ludzi i w której pośredniczą duże złożone powtórzenia, może predysponować do toczenia rumieniowatego układowego [144] i reumatoidalnego zapalenia stawów [145].

Chociaż niektóre inwersje najwyraźniej same nie mają konsekwencji fenotypowych, posiadanie określonego allelu może predysponować do innych rearanżacji w tym samym regionie genomu, co z kolei prowadzi do choroby. W tych przypadkach rodzice osób dotkniętych chorobą wykazują zwiększoną częstość inwersji jednego z alleli w porównaniu z populacją ogólną. Jednym z pierwszych takich opisanych przykładów był zespół Williamsa-Beurena [146]. Choroba ta jest spowodowana delecją 1,5 Mbp na chromosomie 7 (u rodziców chorych dzieci), a inwersję obejmującą ten sam region wykryto z częstością 12,4% u rodziców pacjentów, chociaż częstość u chorych dzieci

wynosiła 2,9%. . Podobne wyniki zaobserwowano dla delecji powodujących zespół Angelmana [147], gdzie częstość inwersji wynosi ~33% u matek pacjentek, ale tylko 4,5% w grupie pacjentek. Jedynym wyjątkiem jest dystrofia mięśniowa Emery'ego-Dreifussa, która jest zespołem chromosomu X dziedzicznym recesywnie i związanym z zespołem Angelmana, spowodowaną utratą matczynej ekspresji stłumionego genu UBE3A, który dostarcza instrukcji do wytwarzania białka zwanego ligazą białkową ubikwityny E3A . Ponadto, chociaż gen sprawczy jest znany w niektórych przypadkach (np. NSD1 dla zespołu Sotosa) w innych [148], takich jak mikrodelecje Williamsa-Beurena lub 17q21.31, nie został jeszcze zidentyfikowany, ponieważ delecje są duże i eliminują kilka genów. [149] Oprócz delecji inwersje mogą również faworyzować bardziej złożoną organizację chromosomów i translokacje. Tak jest w przypadku regionu 8p23.1, gdzie inwersja 4,5 Mbp może predysponować do tworzenia dicentrycznego chromosomu niosącego pojedynczą kopię odwróconego regionu i powodować duplikacje lub delecje znacznej części chromosomu 8, i ma wiązano z opóźnieniem rozwojowym i upośledzeniem umysłowym [150]. W przypadku matek, które są podwójnie heterozygotyczne pod względem odwrócenia 8p23.1 i innej powszechnej inwersji w chromosomie 4, w której pośredniczą podobne złożone powtórzenia, ten sam region odwrotny jest zaangażowany w wytwarzanie powtarzającej się nie zrównoważonej translacji, która jest jedną z przyczyn zespołu Wolfa-Hirschhorna zespół [151]. Poniższa tabela przedstawia również inne reorganizacje genetyczne i ich skutki :

Region Chromosomu	Długość	Reorganizacja	Zaburzenie
3q29	1.9 Mbp	Delecja	Syndrom Delecji 3q29
4p16	6 Mbp	t(4;8)(p16;p23)	Wolf-Hirschhorn Syndrom
5q35	1.9 Mbp	Delecja	Sotos Syndrom
7q11.23	1.5 Mbp	Delecja	Williams-Beuren Syndrom
8p23.1	4.5 Mbp	Delecja /Duplikacja t(4;8)(p16;p23)	Upośledzenie umysłowe, Wolf-Hirschhorn Syndrom
15q11-q13	4 Mbp	Delecja	Angelman Syndrom
15q13.3	1.8 Mbp	Delecja	Syndrom Mikrodelecji 15q13
15q24	1.2 Mbp	Delecja	Syndrom Mikrodelecji 15q14
17q12	1.5 Mbp	Delecja	RCAD Syndrom
17q21.31	970 Kbp	Delecja	Syndrom Mikrodelecji 17q21.31
Xq28	48 Kbp	Delecja	Dystrofia Mięśniowa Emery-Dreifuss
Yp11.2	4 Mbp	Translokacja PRKX/PRKY	Odwroćenie płci/ Męska niepłodność

Tabela 54. Inwersje predysponujące do chorób oraz rearanżacji genetycznych.

Źródło : Puig M, Casillas S, Villatoro S, Cáceres M. Human inversions and their functional consequences. *Brief Funct Genomics*. 2015 Sep;14(5):369-79.

Głównym mechanizmem, dzięki któremu uważa się, że jeden z alleli inwersji predysponuje do rearanżacji, takich jak delecje, jest specyficzna powtarzalna sekwencja w bezpośredniej (tj. oryginalnej) orientacji. Można to osiągnąć albo przez zastąpienie względnej orientacji wcześniej istniejących powtarzalnych sekwencji odwróceniem, albo przez nagromadzenie zmian strukturalnych, które zwiększają bezpośrednią powtarzalność tylko w jednym haplocyocie. Powtórzenia można było następnie ponownie łączyć, aby wygenerować warianty strukturalne, które nie były możliwe z oryginalnego systemu. Jest to sytuacja znaleziona w inwersji 17q21.31, w której zarówno haplotypy H1, jak i H2 doświadczyły niezależnych duplikacji w odwróconych powtórzeniach, które pierwotnie pośredniczyły w inwersji. Jeden z tych haplotypów, H2D, który występuje częściej w populacjach europejskich, predysponuje do zespołu mikrodelecji 17q21.31, który występuje prawie wyłącznie u osób pochodzenia europejskiego.

Pomimo powyższych dowodów, musimy wziąć pod uwagę, że predyspozycje do innych rearanżacji są słabe, biorąc pod uwagę niską częstość występowania tych chorób i stosunkowo wysoką częstość niektórych inwersji. Dlatego prawdopodobieństwo, że nosicielka inwersji ma dziecko dotknięte chorobą, choć nieco większe niż u nosicielki, jest nadal bardzo niskie. Ponadto nie wszyscy pacjenci z chorobami są nosicielami delecji, a dla tych z innymi typami mutacji inwersje stwierdzone u rodziców mogą być zupełnie nieistotne. W niektórych przypadkach, takich jak zespół Williamsa-Beurena, ostatnie badania nie wykazały istotnego związku między inwersją a delecją, co sugeruje, że zwiększona wrażliwość może nie być całkowicie jasna lub może być ograniczona do pewnych haplotypów.

Jak wcześniej wspomniano, inwersje mogą bezpośrednio wpływać na geny i ich regulację na różnych poziomach, z konsekwencjami od drastycznych do bardziej subtelnych. Chociaż stosunkowo łatwo jest określić, czy inwersja wpływa na gen (zakładając, że znana jest dokładna pozycja punktów przerwania), przewidywanie pośredniego wpływu na regulację genów jest znacznie trudniejsze. Biorąc pod uwagę najbardziej wiarygodne rejestracje inwersji w bazie InvFEST (potwierdzone lub przewidywane), większość z nich jest albo międzygenowa, albo introniczna, ale około 12% może spowodować „zepsucie” genu lub przynajmniej niektórych jego alternatywnych transkryptów. Inwersje mogą również wpływać na strukturę genu z nieznanymi konsekwencjami dla ekspresji genów. W takich przypadkach potrzebne są szczegółowe analizy, aby określić,

w jaki sposób inwersja wpływa na ekspresję zarówno „zepsutych” genów, jak i bardziej odległych genów.

Niektóre inne geny wykazują trwale różnice w różnych zestawach danych z różnych źródeł geograficznych [133]. Na przykład ekspresja genu BLK wykazała dodatnią korelację z liczbą inwersji 8p23.1 [29] w populacji europejskiej, która nie występuje w Azji i Afryce. Wreszcie, poziomy ekspresji z kilku genów zostały powiązane z inwersją tylko w danym zestawie danych, takich jak geny XKR6, CTSB, NEIL2 i MSRA w LCL dla inwersji 8p23.1, PLEKHM1 i CRHR1 w mózdzku dla 17q21. 31 genów inwersji lub CCDC101 (krew) i IL27 (LCL) dla inwersji 16p11, co ilustruje złożoność określania wpływu inwersji na ekspresję genów.

W inwersji 16p11 inne geny poza regionem odwróconym, ale przylegające do punktów przerwania inwersji, również wydają się podlegać różnym ekspresjom z różnymi orientacjami inwersji (geny TUFM i SPNS1 wykazują wyższą ekspresję z jednym allelem w dwóch różnych tkankach), co sugeruje, że efekty inwersji wykraczają poza region odwrócony. [13] Ponadto większość tych różnic w ekspresji jest zachowywana przez model addytywny, w którym heterozygota wykazuje ekspresję pośrednią w porównaniu z obiema homozygotami, chociaż istnieją również geny o wyższej ekspresji u heterozygot, takie jak z IL27 w inwersji 16p11. Dodatkowo wykryto różnice w ekspresji w genach wielu kopii zlokalizowanych w punktach przerwania inwersji (np. LRRC37A i A4 w 17q21.31 lub EIF3C i EIF3CL w 16p11) lub w rodzinach genów z kopiami zlokalizowanymi zarówno wewnątrz, jak i na zewnątrz odwróconego regionu (np. SULTA1 , geny SULTA2 i SULTA4 w 16p11). Te zgłoszone różnice należy jednak traktować z ostrożnością, ponieważ trudno jest dokładnie określić ilościowo ekspresję genów z każdej pojedynczej kopii przy użyciu mikromacierzy lub RNA-Seq. Przykładem tego jest LRRC37A, którego ekspresja wykazuje bardzo znaczące różnice między allelami inwersji 17q21.31 w kilku tkankach mózgu, ale użyte sondy są zdolne do wiązania więcej niż jednego docelowego genu z rodziny. [152] Warto zauważyć, że kilka wykrytych różnic w ekspresji genów jest powiązanych z fenotypem, zapewniając mechanizm, dzięki któremu inwersja może mieć funkcjonalne konsekwencje. Ekspresja BLK może pośredniczyć w zwiększonym ryzyku wystąpienia toczenia rumieniowatego układowego i reumatoidalnego zapalenia stawów związanych z jedną z odwróconych form 8p23.1 oraz nadprodukcji białka Tau kodowanego przez MAPT (zwiększona inwersja haplotypu 17q21.31 H1) w ciałach komórek nerwowych został powiązany z

kilkoma zaburzeniami neurodegeneracyjnymi. W inwersji 16p11 zmiany w ekspresji genów odpowiedzialnych za równowagę energetyczną i odporność, takich jak TUFM i IL27, mogą wyjaśniać działanie ochronne przed współistnieniem astmy i otyłości. Jednak w żadnym z tych przypadków nie przeprowadzono ogólnej analizy różnicowej ekspresji w całym genomie w celu zidentyfikowania możliwych zmian w ekspresji w dodatkowych genach.

Dlatego istnieje kilka teorii na temat fenotypowych skutków inwersji i zmian w ekspresji genów, ale wymagają one szerszych i głębszych badań. W każdym razie można je wykorzystać jako podstawę do odkrycia nowych powiązań i przyczyn rzadkich i niezbyt rzadkich chorób dziedzicznych.

Nie wiadomo, jakim mechanizmem, jeśli w ogóle, inwersja chromosomu 16 mogłaby wpływać na otyłość, ale jak pokazuje powyższa dyskusja, możliwości jest wiele.

4.5 Limitacje badania.

1. Wielkość próby w bazie Populous, choć duża, mogła nie być wystarczająco reprezentatywna dla populacji Polski. Baza danych Populous, która została udostępniona do ustalenia tej tezy, zawierała 6047 niepowiązanych ze sobą polskich ochotników. Selekcji w tej grupie dokonano poprzez włączenie, wyłącznie osób zdrowych (dokonywanych metodą samooceny) oraz tych, którzy podali informacje o swoim roku życia, płci, powiecie i liczbie posiadanych dzieci w roku 2012, kiedy wypełniali kwestionariusz. Maksymalna liczba badanych, która została uwzględniona w analizie statystycznej, wyniosła 5760 osób. Wykluczono brakujące dane genotypowania pojedynczych SNP'ów oraz brakujące wartości BMI od ponad 1038 osobników (18%). Zatem finalna wielkość grupy badanej wyniosła 4722 osób.

2. Próbki DNA badanych zostały pobrane ze śliny, która mogła zawierać mikrobiom jamy ustnej, który teoretycznie mógł zanieczyścić wyniki. Chociaż wydajność DNA jest niższa ze śliny w porównaniu z płynem krwi [153], odsetek odpowiedzi osób biorących udział w badaniach naukowych jest znacznie wyższy w przypadku pobierania śliny w porównaniu z pobieraniem krwi [154]. Jednak ta nieinwazyjna metoda ma większą szansę zanieczyszczenia obcym DNA ze względu na obecność mikrobiomu w jamie ustnej człowieka. Redukcję zanieczyszczenia przez obcy genotyp DNA, ustalono przez zastosowanie etapów przetwarzania zalecanych przez firmę Illumina i/lub długości używanych sond na macierzach beadchip firmy Illumina.

3. Wskaźnik BMI liczony jest tylko z wagi oraz wzrostu nie pokazuje on dokładnego składu ciała. Niestety nie jest on idealnym wskaźnikiem otyłości, ponieważ wysportowane osoby również mogą ważyć więcej. W użytej bazie danych nie mamy dostępnych innych parametrów takich jak np. aktywność fizyczna czy skład masy ciała, dlatego nie można zweryfikować czy dana osoba jest otyła czy bardzo wysportowana.

4. Nie mamy potwierdzenia przy użyciu innej metody np. techniki FISH, że rzeczywiście w tym konkretnym regionie u tych pacjentów występuje inwersja. W tym badaniu możemy opierać się tylko na narzędziach bioinformatycznych.

5. Istotne wyniki wartości p nie przetrwają wielokrotnych korekt testowych (np. korekty Bonferroniego).

4.6 Wnioski.

Podsumowując, pomimo możliwych problemów, jakie można napotkać przy wykonywaniu takiego badania, teoretycznie możliwe jest znalezienie powiązań genetycznych ze zwiększonym BMI przy bardzo dużych bazach danych. W powyższym badaniu prawdopodobnie znaleziono powiązania inwersji chromosomu 16, genu TUFM, genu CCDC101 oraz genu SPNS1 ze zwiększoną wagą oraz w przypadku genu CCDC101 również z prawdopodobną predyspozycją do działania ochronnego.

Jednakże biorąc pod uwagę limitację badania, a zwłaszcza to, że chociaż liczebność grupy badawczej była duża, nie była ona na tyle duża, aby dać statystycznie istotne różnice po korektach (np. korekcie Bonferroniego). Podobnie jak w przypadku wszystkich niereplikowanych wyników, oprócz błędu losowego, nie można wykluczyć dość licznych możliwości wystąpienia błędów systematycznych (oprócz skorygowanych i wynikających z ograniczeń, np. dotyczących regresji), dla wszystkich wyników konieczna jest replikacja.

Mimo wszystko uzyskane wyniki dają nam pogląd na to, że chromosom 16 jest ciekawym miejsce do zbadania i jest szansa, że zarówno inwersja jak i geny leżące obok niej mogą predysponować do zwiększonej wagi lub działać ochronnie. Jako, że otyłość jest chorobą cywilizacyjną, niesie ze sobą wiele powikłań oraz przyczynia się do powstania innych groźniejszych chorób, tak naprawdę każda wskazówka co do genetycznej predyspozycji jest warta zbadania. Im więcej znajdziemy genetycznych powiązań tym większa szansa, aby uchronić przyszłe pokolenia przed tą chorobą. Oczywiście należy również pamiętać, że otyłość to nie tylko genetyka ale również styl życia i środowisko, które ma bardzo duży wpływ na pojawienie się tej choroby. Nie wszystkie osoby otyłe to osoby, które mają genetyczne predyspozycje. Mimo wszystko badania genetyczne w kierunku otyłości mogą pomóc w zapobieganiu tej choroby, ponieważ wiedząc o byciu genetycznie podatną na tę chorobę, dana osoba będzie mogła zadbać bardziej o swój styl życia czy dietę. Uważam, że badania genetyczne w tym kierunku to przyszłość a uzyskane wyniki z tej pracy badawczej mogą znacznie zawęzić obszar poszukiwań wśród wszystkich genów czy mutacji.

Streszczenie

Inwersje chromosomowe są zróżnicowaną klasą mutacji chromosomowych. Mogą być małe lub duże, o długości nawet do 900 000 par zasad. Naukowcy odkryli, że inwersje chromosomowe prawdopodobnie biorą udział w ewolucji genomu oraz mogą być odpowiedzialne za choroby takie jak na przykład Zespół Sotosa czy upośledzenie umysłowe. Inne badania wykazały, że inwersje mogą mieć wpływ na naszą płodność lub być odpowiedzialne za predyspozycje do otyłości.

Otyłość jest uważana za pandemię obecnego stulecia przez Światową Organizację Zdrowia (WHO). Jest to zaburzenie charakteryzujące się nieproporcjonalnym wzrostem masy ciała w stosunku do wzrostu, głównie na skutek gromadzenia się tkanki tłuszczowej. . Dieta oraz czynniki społeczne, ekonomiczne i środowiskowe to główne przyczyny otyłości. Na prawdopodobieństwo otyłości może mieć wpływ natura i wychowanie, zwiększane przez genetykę rodziny lub styl życia. Również ważnym czynnikiem wpływającym na otyłość wedle najnowszych badań jest mikrobiom. Niektóre z chorób współistniejących związanych z nadwagą i otyłością to cukrzyca typu 2, nadciśnienie, udar, choroba wieńcowa, zastoinowa niewydolność serca, astma , przewlekły ból pleców, choroba zwyrodnieniowa stawów, zatorowość płucna, choroby pęcherzyka żółciowego, a także zwiększone ryzyko niepełnosprawności. Jednak jednym z najpoważniejszych skutków otyłości są nowotwory takie jak rak piersi, endometrium, jajnika, jelita grubego, przelyku, nerek, trzustki czy prostaty. Jak dotąd najskuteczniejsze metody leczenia obejmują zmiany stylu życia i diety. Osobom z chorobami współistniejącymi, które nie są w stanie schudnąć poprzez samą modyfikację stylu życia, zaleca się farmakoterapię i chirurgię bariatryczną.

Biorąc pod uwagę fakt, że otyłość jest bardzo poważną chorobą o zagrażających życiu konsekwencjach, bardzo ważna jest znajomość jej mechanizmów i czynników predysponujących. Stąd coraz większa popularność badań, w których poszukiwane są predyspozycje genetyczne do nadwagi i otyłości. Na przykład badania wykazały, że mutacje w genach LEPR, MC4R czy FTO mogą predysponować do otyłości.

Cel pracy:

Głównym celem pracy była analiza związku inwersji chromosomowej 16p11.2 oraz genów występujących w regionie z predyspozycją do wystąpienia otyłości i nadwagi w populacji Polski, które są kontynuacją badania zawartego w mojej pracy magisterskiej („A genetic sequence inversion on chromosome 16 in the Polish population.” 2018).

Materiały i Metodyka:

Po wykonaniu genotypowania 6047 osób przez „Laboratorium Biobanku w Zakładzie Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego” dane zostały przekazane do PUM w drodze umowy transferowej. Na podstawie obliczeń w tej pracy utworzono kodowanie R za pomocą PLINK zaimplementowanego w dedykowanym skrypcie R, a następnie za pomocą MAFFT i JalView ustalono inwersję chromosomu 16. Następnie za pomocą R wygenerowano bazę danych zawierającą tylko polimorfizmy pojedynczych nukleotydów w obszarze inwersji. Analizę statystyczną przeprowadzono w programie R za pomocą testów: rho Spearmana, testu Kruskala-Wallisa, testów asocjacji z wykorzystaniem biblioteki R [SNPassoc] z funkcją WGassociation oraz testów Fishera i Cochra. Funkcja WGassociation przeanalizowała następujące modele genetyczne: dominujący, recesywny, heterozygotyczny i logarytmiczny.

Wyniki:

Po przeprowadzeniu analizy badań asocjacyjnych między modelami genetycznymi nadwagi i otyłości, a SNP'ami w obszarze inwersji chromosomu 16 wykazano, że jedyna istotna różnica statystyczna występuje w modelu recesywnym RS149299 ($p=0,043$) między grupą osób z prawidłową masą ciała oraz grupą osób z otyłością. W przypadku tego SNP'u, u osób otyłych genotyp C/C był częstszy niż u osób o wadze prawidłowej. W przypadku genów leżących w obszarze inwersji, istotność statystyczną osiągnął gen *TUFM* w modelu dominującym dla RS8061877 ($p=0.032$) zarówno dla grup BMI (grupa z wagą normalną i grupa z otyłością) jak i BMI jako zmiennej numerycznej, gdzie osoby z genotypem CC miały wyższe wartości BMI. Gen *CCDC101*, osiągnął istotność statystyczną w modelu przewagi heterozygoty dla RS4788073 ($p=0.025$, $p=0.00012$) w przypadku porównania grupy z niedowagą i wagą prawidłową i w przypadku grupy z niedowagą i otyłością oraz w modelu recesywnym dla RS11401 ($p=0.017$) w przypadku porównania grupy z wagą normalną i nadwagą. Zarówno RS4788073 jak i RS11401 działały ochronnie i prawdopodobnie mogą predysponować do niższej wagi. Wartość

p.value dla RS4788073, przy porównaniu grupy osób z niedowagą i otyłością, przeszła jako jedyna korektę Bonferroniego. Gen *SPNS1* w modelu przewagi heterozygoty dla RS3922668 ($p=0.03$) przy porównaniu grupy z wagą prawidłową i otyłością również osiągnął istotność statystyczną. Przemawia to w tym przypadku za tym, że osoby będące homozygotami mogą mieć większe predyspozycje do otyłości niż heterozygoty. Powiązania z innymi genami nie osiągnęły istotności statystycznej. Wszystkie analizy, z wyjątkiem wyników dla RS4788073, nie przeszły korekty Bonferroniego.

Wnioski:

Podsumowując, powyższe badanie prawdopodobnie wskazuje na związek inwersji chromosomu 16 z otyłością (trzy SNP'y dały podobne wyniki, ale tylko jeden przekroczył istotność statystyczną z powodu dodatkowej mutacji w jednej z wersji inwersji). Również prawdopodobny związek ze zwiększoną wagą może mieć gen *TUFM*, gen *CCDC101* oraz gen *SPNS1*. W przypadku genu *CCDC101* również prawdopodobna jest predyspozycja do działania ochronnego. Jednakże biorąc pod uwagę limitację badania, a zwłaszcza to, że chociaż liczebność grupy badawczej była duża, nie była ona na tyle wystarczająca, aby dać statystycznie istotne różnice po korektach (np. korekcie Bonferroniego), co udało się tylko osiągnąć w przypadku tylko jednej analizy. Niemniej jednak uzyskane wyniki pozwalają sądzić, że chromosom 16 jest potencjalnie interesującym miejscem do zbadania i istnieje szansa, że zarówno inwersja, jak i ocenione geny mogą predysponować do zwiększenia wagi lub działać ochronnie.

Abstract

Chromosomal inversions are a diverse class of chromosomal mutations. They can be small or large, varying in length up to 900 000 base-pairs. Scientists have discovered that chromosomal inversions are likely involved in genome evolution and may be responsible for diseases such as Sotos Syndrome and mental retardation. Other studies have shown that inversions may affect fertility or be responsible for predisposition to obesity.

Obesity is considered a pandemic of this century by the World Health Organization (WHO). It is a disorder characterized by a disproportionate increase in body weight in relation to height, due to the accumulation of adipose tissue. Diet and social, economic and environmental factors are the main causes of obesity. The likelihood of obesity can be influenced by family genetics or lifestyle and increased by upbringing and the environment, including the microbiome. Some of the comorbidities associated with being overweight and obese are type 2 diabetes, high blood pressure, stroke, coronary artery disease, congestive heart failure, asthma, chronic back pain, osteoarthritis, pulmonary embolism and gallbladder disease, as well as an increased risk of disability. However, one of the most serious effects of obesity are cancers such as breast, endometrial, ovarian, colon, esophageal, kidney, pancreatic and prostate cancers. The most effective treatments so far involve lifestyle and dietary changes. For people with comorbidities and who are unable to lose weight through lifestyle modification alone, pharmacotherapy and bariatric surgery are recommended.

Considering the fact that obesity is a very serious disease with life-threatening consequences, knowledge of its mechanisms and predisposing factors is very important. Hence the growing amount of research in which genetic predispositions to overweight and obesity are sought. For example, studies have shown that mutations in the *LEPR*, *MC4R* or *FTO* genes can predispose to obesity.

Goal:

The main purpose of the thesis was to analyze the relationship between the 16p11.2 chromosome inversion and genes occurring in the region with the predisposition to obesity and overweight in the Polish population which is the continuation of the research included in my master's thesis („A genetic sequence inversion on chromosome 16 in the Polish population.” 2018).

Materials and Methodology:

Following the genotyping of 6047 subjects, carried out by „Laboratorium Biobanku w Zakład Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego”, the data was transferred to PUM by a transfer agreement. For the basis of the calculations in this thesis, R coding was created using PLINK implemented in a dedicated R script, and then, using MAFFT and JalView, the chromosome 16 inversion was established. Then, using R, a database was generated including only single nucleotide polymorphisms in the inversions area. In this thesis: statistical analysis were performed in the R program using the following tests: Spearman's rho, Kruskal-Wallis tests, and association tests using the R library [SNPassoc] with the function *WGassociation*, as well as Fisher and Cochran tests. The *WGassociation* function analyzed the following genetic models: dominant, recessive, heterozygote and log-additive.

Results:

After performing the analysis association studies between overweight and obesity versus SNP genetic models in the area of chromosome 16 inversion, it was shown that the only significant statistical difference before Bonferroni correction was found with the recessive model RS149299 ($p=0.043$) between the group of people with normal weight and the group of people with obesity. For this SNP in obese people, the C/C genotype was more common than in normal weight people. As for genes lying in the inversion area, statistical significance was achieved with the *TUFM* gene in the dominant model for RS8061877 ($p=0.032$) between BMI groups (normal weight group and obese group) and BMI as a continuous variable versus the genetic model, where people with the CC genotype had higher BMI. The *CCDC101* gene in the heterozygote model for RS4788073 ($p=0.025$, $p=0.00012$) when comparing underweight and normal weight groups or comparing underweight and obesity, and in the recessive model for RS11401 ($p=0.017$) with normal weight compared with overweight also were statistically significant. RS4788073 and RS11401 were possibly protective and predisposing to lower weight. The p-value for RS 4788073 when comparing underweight and obesity passed the Bonferroni correction. The *SPNS1* gene with the heterozygote model for RS3922668 ($p=0.03$) comparing normal weight and obesity also gave a low p-value, suggesting that people who are homozygous for either allele - may have a greater predisposition to

obesity than heterozygotes. Associations with other genes did not reach statistical significance. All associations, except RS4788073, did not pass Bonferroni correction.

Conclusions:

In summary, the above study possibly indicates an association of the inversion of chromosome 16 with obesity (the three inversion SNPs gave similar results, but only one crossed statistical significance because of additional mutation on one version of the inversion *in the other SNPs*). SNP minor allele genotypes from the *TUFM* gene, the *CCDC101* gene and the *SPNS1* gene were also possibly associated with increased weight and, in the case of the *CCDC101* gene, with a possible predisposition to a protective effect. Considering the limitations of the study, and especially the fact that although the size of the study group was large, it was not large enough to give statistically significant differences after adjustments (e.g. Bonferroni adjustment) for most comparisons, and only one analysis passed this correction, these results should be treated with caution. Nevertheless, the obtained results give us the idea that chromosome 16 is a possible interesting place to investigate and there is a chance that both the inversion and the genes assessed may predispose to increased weight or act protectively.

Bibliografia

- [1] A. H. Sturtevant, „Genetic Factors Affecting the Strength of Linkage in *Drosophila*.,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, tom 3, nr 9, p. 555–558, 1917.
- [2] Dobzhansky, T., Dobzhansky, T. G, „Genetics of the evolutionary process.,” *Columbia University Press*, tom 139, 1970.
- [3] M. Kirkpatrick, „How and Why Chromosome Inversions Evolve.,” *Plos Biology*, tom 8, nr 9, 2010.
- [4] Andolfatto P, Depaulis F, Navarro A, „Inversion polymorphisms and nucleotide variability in *Drosophila*.,” *Genet Res.*, tom 77, pp. 1-8, 2001.
- [5] Castermans D, Vermeesch J. R, Fryns J. P, Steyaert J. G, Van de Ven W. J. M, et al., „Identification and characterization of the TRIP8 and REEP3 genes on chromosome 10q21.3 as novel candidate genes for autism.,” *Eur J Hum Genet.*, tom 15, pp. 422-431, 2007.
- [6] C. B., „The evolution of sex chromosomes.,” *Science.*, tom 251, nr 4997, pp. 1030-1033, 1991.
- [7] G. L. Bush, S. M. Case, A. C. Wilson and J. L. Patton, „Rapid Speciation and Chromosomal Evolution in Mammals.,” *Proc Natl Acad Sci U S A.*, tom 74, nr 9, pp. 3942-3946, 1977.
- [8] W. M. J. D., *Modes of speciation.*, San Francisco: W.H. Freeman, 1978.
- [9] B. N. Kirkpatrick M, „Chromosome inversions, local adaptation, and speciation.,” *Genetics*, tom 173, nr 4, p. 419–434, 2006.
- [10] Muthuvel A, Ravindran M, Chander A, Subbian C., „Pericentric inversion of chromosome 9 causing infertility and subsequent successful in vitro fertilization.,” *Niger Med J.*, tom 57, nr 2, p. 142–144, 2016.
- [11] Hossein Mozdarani, Anahita Mohseni Meybodi, Hamideh Karimi, „Impact of pericentric inversion of Chromosome 9 [inv (9) (p11q12)] on infertility.,” *Indian J Hum Genet*, tom 13, nr 1, p. 26–29, 2007.
- [12] Hreinn Stefansson , Agnar Helgason, Gudmar Thorleifsson, Valgerdur Steinthorsdottir, et al., „A common inversion under selection in Europeans.,” *Nature Genetics*, tom 37, p. 129–137, 2005.
- [13] González JR, Cáceres A, Esko T, et al., „A Common 16p11.2 Inversion Underlies the Joint Susceptibility to Asthma and Obesity.,” *Am J Hum Genet*, tom 94, nr 3, p. 361–372, 2014.
- [14] Varela LM, Ortega A, Bermudez B, Lopez S, Pacheco YM, Villar J, Abia R, Muriana FJ. , „A high-fat meal promotes lipid-load and apolipoprotein B-48

- receptor transcriptional activity in circulating monocytes.," *Am J Clin Nutr.*, tom 93, nr 5, pp. 918-25, 2011.
- [15] Thorleifsson G, Walters GB, Gudbjartsson DF, Steinthorsdottir V, Sulem P, Helgadóttir A, Styrkarsdóttir U, Gretarsdóttir S, Thorlacius S, Jonsdóttir I, Jonsdóttir T, Olafsdóttir EJ, Olafsdóttir GH, Jonsson T, Jonsson F, et al., „Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity.," *Nat Genet.* , tom 41, nr 1, pp. 8-24, 2009.
- [16] Lei Y, Wen H, Yu Y, Taxman DJ, Zhang L, Widman DG, Swanson KV, Wen KW, Damania B, Moore CB, Giguère PM, Siderovski DP, Hiscott J, Razani B, Semenkovich CF, Chen X, Ting JP. , „The mitochondrial proteins NLRX1 and TUFM form a complex that regulates type I interferon and autophagy.," *Immunity*, tom 36, nr 6, pp. 933-46, 2012.
- [17] Wallace DC., „Colloquium paper: bioenergetics, the origins of complexity, and the ascent of man.," *Proc Natl Acad Sci U S A.*, tom 107, nr 2, pp. 8947-53, 2010.
- [18] Schon EA, DiMauro S, Hirano M. , „Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations.," *Nat Rev Genet.* , tom 13, nr 12, pp. 878-90, 2012.
- [19] Coffey EC, Astumian M, Alrowaished SS, Schaffer C, Henry CA. , „Lysosomal Function Impacts the Skeletal Muscle Extracellular Matrix.," *J Dev Biol.*, tom 9, nr 4, 2021.
- [20] Coughtrie MW., „Sulfation through the looking glass--recent advances in sulfotransferase research for the curious.," *Pharmacogenomics J.*, tom 2, nr 5, 2002.
- [21] „SGF29," Genecards, [Online]. Available: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SGF29&keywords=SGF29>.
- [22] „Globalny raport o stanie chorób niezakaźnych 2014.," Światowa Organizacja Zdrowia, Genewa, 2014.
- [23] „Obesity and Overweight," World Health Organization (WHO), 2021. [Online]. Available: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. [Data uzyskania dostępu: 2022].
- [24] NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC)., „Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults.," *Lancet*, tom 390, nr 10113, pp. 2627-2642, 2017.
- [25] Yoo S., „Dynamic Energy Balance and Obesity Prevention.," *J Obes Metab Syndr.*, tom 27, nr 4, pp. 203-212, 2018.

- [26] Duffey KJ, Gordon-Larsen P, Jacobs DR Jr, Williams OD, Popkin BM. , „Differential associations of fast food and restaurant food consumption with 3-y change in body mass index: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study.,” *Am J Clin Nutr.*, tom 85, nr 1, pp. 201-8, 2007.
- [27] Corica D, Aversa T, Valenzise M, Messina MF, Alibrandi A, De Luca F, Wasniewska M., „Does Family History of Obesity, Cardiovascular, and Metabolic Diseases Influence Onset and Severity of Childhood Obesity?,” *Front Endocrinol (Lausanne)*, tom 9, nr 187, 2018.
- [28] Ben Slama F, Achour A, Belhadj O, Hsairi M, Oueslati M, Achour N. , „Obesity and life style in a population of male school children aged 6 to 10 years in Ariana (Tunisia),” *Tunis Med.*, tom 80, nr 9, pp. 542-7, 2002.
- [29] Salam RA, Padhani ZA, Das JK, Shaikh AY, Hoodbhoy Z, Jeelani SM, Lassi ZS, Bhutta ZA., „Effects of Lifestyle Modification Interventions to Prevent and Manage Child and Adolescent Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis.,” *Nutrients*, tom 12, nr 8, 2020.
- [30] Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI., „Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells.,” *Proc Natl Acad Sci U S A.* , tom 99, nr 24, pp. 15451-5, 2002.
- [31] Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D., „Role of the normal gut microbiota.,” *World J Gastroenterol.*, tom 21, nr 29, pp. 8787-803, 2015.
- [32] DeGruttola AK, Low D, Mizoguchi A, Mizoguchi E., „Current Understanding of Dysbiosis in Disease in Human and Animal Models,” *Inflamm Bowel Dis.*, tom 22, nr 5, pp. 1137-50, 2016.
- [33] Cañete R, Gil-Campos M, Aguilera CM, Gil A., „Development of insulin resistance and its relation to diet in the obese child.,” *Eur J Nutr.*, tom 46, nr 4, pp. 181-7, 2007.
- [34] G. S. Hotamisligil, „Inflammation and metabolic disorders.,” *Nature*, tom 444, nr 7121, pp. 860-7, 2006.
- [35] Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B., „Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance.,” *Eur Cytokine Netw.*, tom 17, nr 1, pp. 4-12, 2006.
- [36] Tilg H, Moschen AR., „Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity.,” *Nat Rev Immunol.*, tom 6, nr 10, pp. 772-83, 2006.
- [37] Caputo T, Gilardi F, Desvergne B., „From chronic overnutrition to metaflammation and insulin resistance: adipose tissue and liver contributions.,” *FEBS Lett*, tom 591, nr 19, pp. 3061-3088, 2017.

- [38] Hotamisligil GS., „Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease.,” *Cell*, tom 140, nr 6, pp. 900-17, 2010.
- [39] Lee BC, Lee J., „Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance.,” *Biochim Biophys Acta.* , tom 1842, nr 3, pp. 446-62, 2014.
- [40] Gil-Campos M, Cañete RR, Gil A., „Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity.,” *Clin Nutr.*, tom 23, nr 5, pp. 963-74, 2004.
- [41] Aguilera CM, Gomez-Llorente C, Tofe I, Gil-Campos M, Cañete R, Gil Á. , „Genome-wide expression in visceral adipose tissue from obese prepubertal children.,” *Int J Mol Sci.*, tom 16, nr 4, pp. 7723-37, 2015.
- [42] Rupérez AI, Olza J, Gil-Campos M, Leis R, Bueno G, Aguilera CM, Gil A, Moreno LA., „Cardiovascular risk biomarkers and metabolically unhealthy status in prepubertal children: Comparison of definitions.,” *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* , tom 28, nr 5, pp. 524-530, 2018.
- [43] Vallgård S, Nielsen MEJ, Hansen AKK, Cathaoir KÓ, Hartlev M, Holm L, Christensen BJ, Jensen JD, Sørensen TIA, Sandøe P., „Should Europe follow the US and declare obesity a disease?: a discussion of the so-called utilitarian argument.,” *Eur J Clin Nutr.*, tom 71, nr 11, pp. 1263-1267, 2017.
- [44] Guh DP, Zhang W, Bansback N, Amarsi Z, Birmingham CL, Anis AH. , „The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis.,” *BMC Public Health*, tom 9, nr 88, 2009.
- [45] Reilly JJ, Kelly J. , „Long-term impact of overweight and obesity in childhood and adolescence on morbidity and premature mortality in adulthood: systematic review,” *Int J Obes (Lond)*., tom 35, nr 7, pp. 891-8, 2011.
- [46] F. X. Pi-Sunyer, „Health implications of obesity,” *Am J Clin Nutr.*, tom 53, nr 6, pp. 1595S-1603, 1991.
- [47] Djalalinia S, Qorbani M, Peykari N, Kelishadi R., „Health impacts of Obesity.,” *Pak J Med Sci.* , tom 31, nr 1, pp. 239-42, 2015.
- [48] Scott KM, Bruffaerts R, Simon GE, Alonso J, Angermeyer M, de Girolamo G, Demyttenaere K, et al., „Obesity and mental disorders in the general population: results from the world mental health surveys.,” *Int J Obes (Lond)*, tom 32, nr 1, pp. 192-200, 2008.
- [49] A. Hilbert, „The burden of the burden: current advances in weight stigma research.,” *Obes Facts.*, tom 3, nr 1, pp. 5-6, 2010.
- [50] Rosengren A, Lissner L. , „The sociology of obesity.,” *Front Horm Res.* , tom 36, pp. 260-270, 2008.

- [51] „When could overweight and obesity overtake smoking as the biggest cause of cancer in the UK?,” Cancer Intelligence Team, Policy & Information Directorate., 2018.
- [52] Steele CB, Thomas CC, Henley SJ, Massetti GM, Galuska DA, Agurs-Collins T, Puckett M, Richardson LC. Vital Signs: „Trends in Incidence of Cancers Associated with Overweight and Obesity - United States, 2005-2014,” *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.*, tom 66, nr 39, pp. 1052-1058, 2017.
- [53] Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. „Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults.,” *N Engl J Med.* , tom 348, nr 17, pp. 1625-38, 2003.
- [54] Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F, Straif K, „International Agency for Research on Cancer Handbook Working Group. Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group.,” *N Engl J Med.* , tom 375, nr 8, pp. 794-8, 2016.
- [55] Schauer DP, Feigelson HS, Koebnick C, Caan B, Weinmann S, Leonard AC, Powers JD, Yenumula PR, Arterburn DE. „Bariatric Surgery and the Risk of Cancer in a Large Multisite Cohort.,” *Ann Surg.*, tom 269, nr 1, pp. 95-101, 2019.
- [56] „Worldwide burden of cancer attributable to diabetes and high body-mass index: a comparative risk assessment.,” *Lancet Diabetes Endocrinol.*, tom 6, nr 6, 2018.
- [57] Hanahan D, Weinberg RA. „Hallmarks of cancer: the next generation.,” *Cell*, tom 144, nr 5, pp. 646-74, 2011.
- [58] Lönnqvist F, Nordfors L, Jansson M, Thörne A, Schalling M, Arner P. „Leptin secretion from adipose tissue in women. Relationship to plasma levels and gene expression.,” *J Clin Invest.*, tom 99, nr 10, pp. 2398-404, 1997.
- [59] Garofalo C, Surmacz E. „Leptin and cancer.,” *J Cell Physiol.*, tom 207, nr 1, pp. 12-22, 2006.
- [60] Chung KM, Singh J, Lawres L, Dorans KJ, Garcia C, Burkhardt DB, Robbins R, et al., „Endocrine-Exocrine Signaling Drives Obesity-Associated Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.,” *Cell*, tom 181, nr 4, pp. 832-847, 2020.
- [61] Lukanova A, Lundin E, Zeleniuch-Jacquotte A, Muti P, Mure A, Rinaldi S, Dossus L, et al., „Body mass index, circulating levels of sex-steroid hormones, IGF-I and IGF-binding protein-3: a cross-sectional study in healthy women.,” *Eur J Endocrinol.*, tom 150, nr 2, pp. 161-71, 2004.
- [62] Foster PA. „Oestrogen and colorectal cancer: mechanisms and controversies.,” *Int J Colorectal Dis.*, tom 28, nr 6, pp. 737-49, 2013.

- [63] Han L, Ma Q, Li J, Liu H, Li W, Ma G, Xu Q, Zhou S, Wu E. , „High glucose promotes pancreatic cancer cell proliferation via the induction of EGF expression and transactivation of EGFR,” *PLoS One*, tom 6, nr 11, 2011.
- [64] Gallagher EJ, LeRoith D., „Hyperinsulinaemia in cancer.,” *Nat Rev Cancer.*, tom 20, nr 11, pp. 629-644, 2020.
- [65] Ling S, Brown K, Miksza JK, Howells L, Morrison A, Issa E, Yates T, Khunti K, Davies MJ, Zaccardi F., „Association of Type 2 Diabetes With Cancer: A Meta-analysis With Bias Analysis for Unmeasured Confounding in 151 Cohorts Comprising 32 Million People.,” *Diabetes Care*, tom 43, nr 9, pp. 2313-2322, 2020.
- [66] Lewitt MS, Dent MS, Hall K., „The Insulin-Like Growth Factor System in Obesity, Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Mellitus.,” *J Clin Med.*, tom 3, nr 4, pp. 1561-74, 2014.
- [67] Porta C, De Amici M, Quaglini S, Paglino C, Tagliani F, Boncimino A, Moratti R, Corazza GR., „Circulating interleukin-6 as a tumor marker for hepatocellular carcinoma.,” *Ann Oncol.* , tom 19, nr 2, pp. 353-8, 2008.
- [68] Park EJ, Lee JH, Yu GY, He G, Ali SR, Holzer RG, Osterreicher CH, Takahashi H, Karin M., „Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression.,” *Cell*, tom 140, nr 2, pp. 197-208, 2010.
- [69] Hao J, Zhang Y, Yan X, Yan F, Sun Y, Zeng J, Waigel S, Yin Y, Fraig MM, Egilmez NK, et al., „Circulating Adipose Fatty Acid Binding Protein Is a New Link Underlying Obesity-Associated Breast/Mammary Tumor Development.,” *Cell Metab.*, tom 28, nr 5, pp. 689-705, 2018.
- [70] Kadowaki T, Yamauchi T. , „Adiponectin and adiponectin receptors.,” *Endocr Rev.* , tom 26, nr 3, pp. 439-51, 2005.
- [71] Chang E, Choi JM, Kim WJ, Rhee EJ, Oh KW, Lee WY, Park SE, Park SW, Park CY., „Restoration of adiponectin expression via the ERK pathway in TNF α -treated 3T3-L1 adipocytes.,” *Mol Med Rep.*, tom 10, nr 2, pp. 905-10, 2014.
- [72] Cust AE, Kaaks R, Friedenreich C, Bonnet F, Laville M, Lukanova A, Rinaldi S, Dossus L, et al., „Plasma adiponectin levels and endometrial cancer risk in pre- and postmenopausal women.,” *J Clin Endocrinol Metab.*, tom 92, nr 1, pp. 255-63, 2007.
- [73] „Guidelines (2013) for managing overweight and obesity in adults. Preface to the Expert Panel Report (comprehensive version which includes systematic evidence review, evidence statements, and recommendations).,” *Obesity (Silver Spring)*, tom 2, 2014.

- [74] Nguyen B, Clements J., „Obesity management among patients with type 2 diabetes and prediabetes: a focus on lifestyle modifications and evidence of antiobesity medications.,” *Expert Rev Endocrinol Metab.*, tom 12, nr 5, pp. 303-313, 2017.
- [75] Gomez G, Stanford FC., „US health policy and prescription drug coverage of FDA-approved medications for the treatment of obesity.,” *Int J Obes (Lond)*, tom 42, nr 3, pp. 495-500, 2018.
- [76] Yeo GSH, Chao DHM, Siegert AM, Koerperich ZM, Ericson MD, Simonds SE, Larson CM, Luquet S, Clarke I, Sharma S, Clément K, et al., „The melanocortin pathway and energy homeostasis: From discovery to obesity therapy.,” *Mol Metab.*, tom 48, nr 101206, 2021.
- [77] Karri S, Sharma S, Hatware K, Patil K. , „Natural anti-obesity agents and their therapeutic role in management of obesity: A future trend perspective.,” *Biomed Pharmacother.*, tom 110, pp. 224-238, 2019.
- [78] Telles S, Gangadhar BN, Chandwani KD., „Lifestyle Modification in the Prevention and Management of Obesity.,” *J Obes.*, tom 2016, nr 5818601, 2016.
- [79] Osto M, Abegg K, Bueter M, le Roux CW, Cani PD, Lutz TA. , „Roux-en-Y gastric bypass surgery in rats alters gut microbiota profile along the intestine.,” *Physiol Behav.*, tom 119, pp. 92-6, 2013.
- [80] Yu EW, Gao L, Stastka P, Cheney MC, Mahabamunuge J, Torres Soto M, Ford CB, Bryant JA, Henn MR, Hohmann EL., „Fecal microbiota transplantation for the improvement of metabolism in obesity: The FMT-TRIM double-blind placebo-controlled pilot trial.,” *PLoS One*, tom 17, nr 3, 2020.
- [81] Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, Griffin NW, Lombard V, Henrissat B, Bain JR, Muehlbauer MJ, Ilkayeva O, et al., „Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice.,” *Science*, tom 341, nr 6150, 2013.
- [82] „DECLARATION OF HELSINKI – ETHICAL PRINCIPLES FOR MEDICAL RESEARCH INVOLVING HUMAN SUBJECTS,” World Medical Association, Wrzesień 2022. [Online]. Available: <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>. [Data uzyskania dostępu: Listopad 2022].
- [83] „The R Project for Statistical Computing,” [Online]. Available: <https://www.r-project.org/>. [Data uzyskania dostępu: 2022].
- [84] „MAFFT version 7.,” [Online]. Available: <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>. [Data uzyskania dostępu: 2022].
- [85] Katoh K, Frith MC. , „Adding unaligned sequences into an existing alignment using MAFFT and LAST.,” *Bioinformatics*, tom 28, nr 23, pp. 3144-6, 2012.

- [86] K.Katoh., J.Rozewicki, K. D Yamada, „MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization.,” *Brief Bioinform*, tom 20, nr 4, p. 1160–1166, 2019.
- [87] „JalView,” [Online]. Available: <https://www.jalview.org/>. [Data uzyskania dostępu: 2022].
- [88] A. M Waterhouse , J. B Procter, D. Martin, M. Clamp, G. J Barton, „Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench.,” *Bioinformatics*, tom 1, nr 25, pp. 1189-91, 2009.
- [89] D. D'Angelo , S. Lebon , Q.Chen , S. Martin-Brevet, et all., „Defining the Effect of the 16p11.2 Duplication on Cognition, Behavior, and Medical Comorbidities.,” *JAMA Psychiatry*, tom 73, nr 1, pp. 20-30, 2016.
- [90] Connor B. Weir, Arif Jan., „BMI Classification Percentile And Cut Off Points,” National Library of Medicine , [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541070/>. [Data uzyskania dostępu: 2022].
- [91] „ Conduct and Interpret a Spearman Rank Correlation,” Statistics Solutions , [Online]. Available: <https://www.statisticssolutions.com/free-resources/directory-of-statistical-analyses/spearman-rank-correlation/>. [Data uzyskania dostępu: 2022].
- [92] „Simple linear regression,” Wikipedia, [Online]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/Simple_linear_regression. [Data uzyskania dostępu: 2022].
- [93] „Regresja Logistyczna,” Wikipedia, [Online]. Available: https://pl.wikipedia.org/wiki/Regresja_logistyczna. [Data uzyskania dostępu: 2022].
- [94] „Kruskal-Wallis H Test using SPSS Statistics,” Statistics Laerd, [Online]. Available: <https://statistics.laerd.com/spss-tutorials/kruskal-wallis-h-test-using-spss-statistics.php>. [Data uzyskania dostępu: 2022].
- [95] J.R. Gonzalez, V. Moreno, „SNPassoc: an R package to perform whole genome association studies,” Cran R , [Online]. Available: <https://cran.r-project.org/web/packages/SNPassoc/vignettes/SNPassoc.html>.
- [96] „SNPassoc: an R package to perform whole genome association studies.,” *Bioinformatics*, tom 23, nr 7, pp. 644-5, 2007.
- [97] X. Solé , E. Guinó, J. Valls, R.Iniesta, V. Moreno, „SNPStats: a web tool for the analysis of association studies.,” *Bioinformatics*, tom 22, nr 15, pp. 1928-9, 2006.

- [98] „Fisher Exact Test,” Wikipedia, [Online]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/Fisher%27s_exact_test. [Data uzyskania dostępu: 2022].
- [99] „Test Q Cochrańa,” Wikipedia, [Online]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/Cochran%27s_Q_test. [Data uzyskania dostępu: 2022].
- [100] M. Sobalska-Kwapis, A. Suchanecka, M. Słomka, et al., „Genetic association of FTO/IRX region with obesity and overweight in the Polish population.,” *PLoS One*, tom 12, nr 6, 2017.
- [101] „TUFM,” Genecards, [Online]. Available: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TUFM>.
- [102] Loos RJF, Yeo GSH., „The genetics of obesity: from discovery to biology.,” *Nat Rev Genet.*, tom 23, nr 2, pp. 120-133, 2022.
- [103] Chami N, Preuss M, Walker RW, Moscati A, Loos RJF., „The role of polygenic susceptibility to obesity among carriers of pathogenic mutations in MC4R in the UK Biobank population.,” *PLoS Med.*, tom 17, nr 7, 2020.
- [104] Farooqi S, O’Rahilly S, „Genetics of obesity in humans.,” *Endocr Rev.*, tom 27, nr 7, pp. 710-18, 2006.
- [105] Saeed S, Arslan M, Froguel P, „Genetics of Obesity in Consanguineous Populations: Toward Precision Medicine and the Discovery of Novel Obesity Genes.,” *Obesity (Silver Spring)*, tom 26, nr 3, pp. 474-484, 2018.
- [106] Saeed S, Bonnefond A, Manzoor J, Shabbir F, Ayesha H, Philippe J, Durand E, et al., „Genetic variants in LEP, LEPR, and MC4R explain 30% of severe obesity in children from a consanguineous population.,” *Obesity (Silver Spring)*, tom 23, nr 8, pp. 1687-95, 2015.
- [107] Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, Pérusse L, Bouchard C., „The human obesity gene map: the 2005 update.,” *Obesity (Silver Spring)*, tom 14, nr 4, pp. 529-644, 2006.
- [108] Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JR, Elliott KS, Lango H, Rayner NW, Shields B, et al., „A Common Variant in the FTO Gene Is Associated with Body Mass Index and Predisposes to Childhood and Adult Obesity.,” *Science*, tom 11, nr 316, pp. 889-94, 2007.
- [109] 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, et al., „Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology.,” *Nature*, tom 18, nr 7538, pp. 197-206, 2015.

- [110] Redaelli A, Lee JM, Stephens JM, Pashos CL. , „Epidemiology and clinical burden of acute myeloid leukemia.” *Expert Rev Anticancer Ther*, tom 3, p. 695–710, 2003.
- [111] Meyers J, Yu Y, Kaye JA, Davis KL., „Medicare fee-for-service enrollees with primary acute myeloid leukemia: an analysis of treatment patterns, survival, and healthcare resource utilization and costs.” *Appl Health Econ Health Policy.*, tom 11, nr 3, pp. 275-86, 2013.
- [112] Fong CT, Brodeur GM. , „Down's syndrome and leukemia: epidemiology, genetics, cytogenetics and mechanisms of leukemogenesis.” *Cancer Genet Cytogenet.*, tom 28, p. 55–76, 1987.
- [113] Potzsch C, Voigtlander T, Lubbert M., „p53 Germline mutation in a patient with Li-Fraumeni Syndrome and three metachronous malignancies.” *J Cancer Res Clin Oncol.*, tom 128, p. 456–460, 2002.
- [114] Aquino VM., „Acute myelogenous leukemia.” *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* , tom 32, p. 50–58, 2002.
- [115] Reynolds P, Von Behren J, Elkin EP., „Birth characteristics and leukemia in young children.” *Am J Epidemiol.*, tom 155, p. 603–613, 2002.
- [116] De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M, „Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update,” *Blood Cancer J.*, tom 6, nr 7, 2016.
- [117] Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, Van Vlierberghe P, et al., „Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia.” *N Engl J Med.*, tom 366, nr 12, pp. 1079-89, 2012.
- [118] Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al., „Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet,” *Blood* , tom 115, nr 3, pp. 453-74, 2010.
- [119] Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al., „The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes.” *Blood*, tom 114, nr 5, pp. 937-51, 2009.
- [120] Lv, L., Yu, J. & Qi, Z. , „Acute myeloid leukemia with inv(16)(p13.1q22) and deletion of the 5' MYH11/3' CBFβ gene fusion: a report of two cases and literature review.” *Mol Cytogenet.*, tom 13, nr 4, 2020.
- [121] S.J.R.A Chawner, M.J Owen, P.Holmans, „Genotype–phenotype associations in children with copy number variants associated with high neuropsychiatric risk in the UK (IMAGINE-ID): a case-control cohort study.” *The Lancet*, tom 6, nr 6, pp. 493-505, 2019.

- [122] Hanson E, Bernier R, Porche K, Jackson FI, Goin-Kochel RP, Snyder LG, Snow AV, et al., „The cognitive and behavioral phenotype of the 16p11.2 deletion in a clinically ascertained population.,” *Biol Psychiatry*, tom 77, nr 9, pp. 785-93, 2015.
- [123] Mei C, Fedorenko E, Amor DJ, Boys A, Hoeflin C, Carew P, Burgess T, Fisher SE, Morgan AT., „Deep phenotyping of speech and language skills in individuals with 16p11.2 deletion.,” *Eur J Hum Genet.*, tom 26, nr 5, pp. 676-686, 2018.
- [124] Kostopoulou E, Dastamani A, Caiulo S, Antell H, Flanagan SE, Shah P., „Hyperinsulinaemic hypoglycaemia: A new presentation of 16p11.2 deletion syndrome.,” *Clin Endocrinol* , tom 90, nr 5, pp. 766-769, 2019.
- [125] Niarchou, M., Chawner, S.J.R.A., Doherty, J.L. et al., „Psychiatric disorders in children with 16p11.2 deletion and duplication.,” *Transl Psychiatry*, tom 9, nr 8, 2019.
- [126] Filges I, Sparagana S, Sargent M, Selby K, Schlade-Bartusiak K, Lueder GT, Robichaux-Viehoever A, Schlaggar BL, Shimony JS, Shinawi M., „Brain MRI abnormalities and spectrum of neurological and clinical findings in three patients with proximal 16p11.2 microduplication.,” *Am J Med Genet A.*, tom 164A, nr 8, pp. 2003-12, 2014.
- [127] Shinawi M, Liu P, Kang SH, Shen J, Belmont JW, Scott DA, Probst FJ, Craigen WJ, Graham BH, et al., „Recurrent reciprocal 16p11.2 rearrangements associated with global developmental delay, behavioural problems, dysmorphism, epilepsy, and abnormal head size.,” *J Med Genet.*, tom 47, nr 5, pp. 332-41, 2010.
- [128] Fernandez BA, Roberts W, Chung B, Weksberg R, Meyn S, Szatmari P, Joseph-George AM, Mackay S, et al, „Phenotypic spectrum associated with de novo and inherited deletions and duplications at 16p11.2 in individuals ascertained for diagnosis of autism spectrum disorder.,” *J Med Genet.*, tom 47, nr 3, pp. 195-203, 2010.
- [129] Weiss LA, Shen Y, Korn JM, Arking DE, Miller DT, Fossdal R, Saemundsen E, Stefansson H, Ferreira MA, Green T, et al., „Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism.,” *N Engl J Med.*, tom 358, nr 7, pp. 667-75, 2008.
- [130] McCarthy SE, Makarov V, Kirov G, Addington AM, McClellan J, Yoon S, Perkins DO, Dickel DE, Kusenda M, Krastoshevsky O, et al., „Microduplications of 16p11.2 are associated with schizophrenia.,” *Nat Genet.*, tom 47, nr 11, pp. 1223-7, 2009.
- [131] Thomas NS, Bryant V, Maloney V, et al., „Investigation of the origins of human autosomal inversions.,” *Hum Genet.*, tom 123, pp. 607-16, 2008.

- [132] Hsu LY, Benn PA, Tannenbaum HL, et al. , „Chromosomal polymorphisms of 1, 9, 16, and Y in 4 major ethnic groups: a large prenatal study.,” *Am J Med Genet.*, tom 26, pp. 95-101, 1987.
- [133] Puig M, Casillas S, Villatoro S, Cáceres M., „Human inversions and their functional consequences.,” *Brief Funct Genomics*, tom 14, nr 5, pp. 369-79, 2015.
- [134] Lettice LA, Daniels S, Sweeney E, et al., „ Enhancer-adoption as a mechanism of human developmental disease.,” *Hum Mutat.*, tom 32, pp. 1492-9, 2011.
- [135] Bagnall RD, Giannelli F, Green PM., „Polymorphism and hemophilia A causing inversions in distal Xq28: a complex picture.,” *J Thromb Haemost* , tom 3, pp. 2598-9, 2005.
- [136] Bagnall RD, Waseem N, Green PM, et al. , „Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia.,” *A Blood*, tom 99, pp. 168-74, 2002.
- [137] Bondeson ML, Dahl N, Malmgren H, et al. , „Inversion of the IDS gene resulting from recombination with IDS-related sequences is a common cause of the Hunter syndrome.,” *Hum Mol Genet.*, tom 4, pp. 615-21, 1995.
- [138] Rhee J, Arnold M, Boland CR., „Inversion of exons 1-7 of the MSH2 gene is a frequent cause of unexplained Lynch syndrome in one local population.,” *Fam Cancer*, tom 13, pp. 219-25, 2014.
- [139] Baker M, Litvan I, Houlden H, et al. , „Association of an extended haplotype in the tau gene with progressive supranuclear palsy.,” *Hum Mol Genet*, tom 8, pp. 711-5, 1999.
- [140] Webb A, Miller B, Bonasera S, et al. , „Role of the tau gene region chromosome inversion in progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, and related disorders.,” *Arch Neurol*, tom 65, pp. 1473-8, 2008.
- [141] Myers AJ, Kaleem M, Marlowe L, et al. , „The H1c haplotype at the MAPT locus is associated with Alzheimer’s disease.,” *Hum Mol Genet*, tom 14, pp. 2399-404, 2005.
- [142] Skipper L, Wilkes K, Toft M, et al., „ Linkage disequilibrium and association of MAPT H1 in Parkinson disease.,” *Am J Hum Genet.*, tom 75, pp. 669-77, 2004.
- [143] Kong A, Barnard J, Gudbjartsson DF, et al., „ Recombination rate and reproductive success in humans.,” *Nat Genet.*, tom 36, nr 1203-6, 2004.
- [144] Namjou B, Ni Y, Harley ITW, et al. , „The Effect of Inversion at 8p23 on BLK Association with Lupus in Caucasian Population.,” *PLos One*, 2014.
- [145] Ma J, Xiong M, You M, et al. , „Genome-wide association tests of inversions with application to psoriasis.,” *Hum Genet* , tom 133, pp. 967-74, 2014.

- [146] Hobart HH, Morris CA, Mervis CB, et al., „ Inversion of the Williams syndrome region is a common polymorphism found more frequently in parents of children with Williams syndrome.,” *Am J Med Genet C Semin Med Genet.*, tom 154C, pp. 220-8, 2010.
- [147] Gimelli G, Pujana MA, Patricelli MG, et al., „Genomic inversions of human chromosome 15q11-q13 in mothers of Angelman syndrome patients with class II (BP2/3) deletions.,” *Hum Mol Genet.*, tom 12, pp. 849-58, 2003.
- [148] Visser R, Shimokawa O, Harada N, et al., „ Identification of a 3.0-kb major recombination hotspot in patients with Sotos syndrome who carry a common 1.9-Mb microdeletion.,” *Am J Hum Genet* 2005;76:52–67., tom 76, pp. 52-67, 2005.
- [149] Koolen DA, Vissers LELM, Pfundt R, et al. , „A new chromosome 17q21.31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism.,” *Nat Genet.*, tom 38, pp. 999-1001, 2006.
- [150] Hollox EJ, Barber JC, Brookes AJ, et al., „Defensins and the dynamic genome: what we can learn from structural variation at human chromosome band 8p23.1.,” *Genome Res.*, tom 18, pp. 1686-97, 2008.
- [151] Giglio S, Calvari V, Gregato G, et al., „Heterozygous submicroscopic inversions involving olfactory receptor-gene clusters mediate the recurrent t(4;8)(p16;p23) translocation.,” *Am J Hum Genet.*, tom 71, pp. 276-85, 2007.
- [152] De Jong S, Chepelev I, Janson E, et al., „Common inversion polymorphism at 17q21.31 affects expression of multiple genes in tissue-specific manner.,” *BMC Genomics*, tom 13, 20121.
- [153] Abraham, J.E., Maranian, M.J., Spiteri, I. et al., „Saliva samples are a viable alternative to blood samples as a source of DNA for high throughput genotyping.,” *BMC Med Genomics*, tom 5, nr 19, 2012.
- [154] Hansen TV, Simonsen MK, Nielsen FC, Hundrup YA., „Collection of blood, saliva, and buccal cell samples in a pilot study on the Danish nurse cohort: comparison of the response rate and quality of genomic DNA.,” *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, tom 16, nr 10, pp. 2072-6, 2007.