

**Kamila Rydzewska**

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

**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, przełyku, 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).

## **Materialy 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.