

Etiologie časně vzniklé obezity u dětí

MUDr. Irena Hainerová

Klinika dětí a dorostu
3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy



Praha 2007

Tato disertační práce byla vypracována v rámci postgraduálního doktorského studia biomedicíny, zařazeného do oborové rady PDSB Fyziologie a patofyziologie člověka.

Práce vznikla za široké spolupráce Kliniky dětí a dorostu 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Steno Diabetes Center v Dánsku.

Autor: **MUDr. Irena Hainerová**

Adresa pracoviště: Klinika dětí a dorostu 3. LFUK a FNKV

Šrobárova 50

100 34 Praha 10

tel: +420 267 162 561

E-mail: ihainer@hotmail.com

Školitel: **Prof. MUDr. Jan Lebl, Csc.**

Adresa pracoviště: V Úvalu 84

150 06 Praha 5

Oponenti:

prof. MUDr. RNDr. Luboslav Stárka, DrSc. – Endokrinologický ústav AVČR Praha

prof. MUDr. Terezie Pelikánová, DrSc. – IKEM Praha

doc. MUDr. Jiřina Zapletalová, PhD. – Dětská klinika LF UP Olomouc

Obhajoba disertační práce se koná dne: 18. října 2007 od 11,30 hodin

PŘEDMLUVA A PODĚKOVÁNÍ

Výsledky této práce vznikly ve spolupráci Kliniky dětí a dorostu UK-3.LF, Praha se Steno Diabetes Center, Gentofte, Dánsko v letech 2003 - 2007.

Cílem této doktorské práce bylo prokázat genetické vlivy, které se podílejí na vzniku obezity, u kohorty českých dětí s časně vzniklou obezitou. Práce se zaměřila zejména na geny, které nezávisle na prostředí vedou ke vzniku obezity a které se uplatňují v patogenezi tzv. monogenních forem obezit. Výsledky byly z větší části již publikovány v mezinárodně uznávaných časopisech s faktorem impaktu; některé rukopisy jsou ještě v recenzním řízení.

Klíčové výsledky studií jsou shrnuty v následujících článcích:

STUDIE 1: Melanokortinový receptor 4. typu (MC4R)

Hainerová I, Larsen LH, Holst B, Finková M, Hainer V, Lebl J, Hansen T, Pedersen O. Melanocortin 4 receptor mutations in obese Czech children: studies of prevalence, phenotype development, weight reduction response and functional analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 (v tisku).

STUDIE 2: Neuromedin U (NMU)

Hainerová I, Torekov SS, Ek J, Finková M, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Madsen OD, Lebl J, Hansen T, Pedersen O. Association between Neuromedin U gene variants and overweight and obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(12): 5057-5063.

STUDIE 3: Growth hormone secretagogue receptor (GHSR)

Larsen LH, Gjesing AP, Torekov SS, **Hainerová I**, Johansen A, Albrechtsen A, Boj S, Holst B, Harper A, Urhammer SA, Hamid YH, Black E, Glümer C, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Holst JJ, Echwald SM, Eiberg H, Astrup A, Sørensen TIA, Lebl J, Schwartz TW, Hansen T, Pedersen O. Family- and population-based studies of genetic variation of the ghrelin receptor and relationships to obesity. Nabídnuo k publikaci v *J Clin Endocrinol Metab.*

STUDIE 4: Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR-alfa)

Sparsø T, Hussain MS, Andersen G, **Hainerová I**, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Hansen T, Pedersen O. Relationships between the functional PPAR α Leu162Val polymorphism and

obesity, type 2 diabetes, dyslipidaemia, and related quantitative traits in studies of 5799 middle-aged white people. *Mol Genet Metab.* 2007; 90(2): 205-209.

Chtěla bych vyjádřit dík svému školiteli prof. *Janovi Leblovi* za jeho podporu, entusiasmus, inspiraci a vedení během celého postgraduálního studia. Dále bych chtěla poděkovat svým dánským kolegům ze Steno Diabetes Center, jejichž spolupráce si nesmírně vážím. Dánská skupina vedena prof. Olufem Pedersenem mi nejen otevřela oči světu metod genetické analýzy, ale také mi ukázala cestu k řešení vědeckých úkolů.

Tímto bych chtěla poděkovat prof. *Olufovi Pedersonovi* za nesčetné množství cenných připomínek ke vznikajícím rukopisům, Dr. *Torbenovi Hansenovi* za jeho nápady a zapálení pro vědu, dále postgraduálním studentkám *Lesli Larsen* a *Signe Torekov* za cenné rady a připomínky. Nemalý dík náleží laborantkám *Annemette Forman*, *Marianne Stendal* a *Lise Wantzin* za trpělivost při nácviu laboratorních metodik.

Tato práce by nemohla vzniknout bez pacientů a jejich rodin, kterým patří dík za spolupráci. Velká část pacientů pochází z *Léčebny Dr. L. Filipa* v Poděbradech, *Lázeňské léčebny Mánes* v Karlových Varech a *Dětské ozdravovny* ve Vrchlabí. Proto bych chtěla poděkovat veškerému personálu těchto center.

Zároveň bych chtěla poděkovat všem svým kolegům z *Kliniky dětí a dorostu UK-3. lékařské fakulty a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady*, kteří mě podpořili v klinických začátcích i v dalších letech. Velmi si vážím vřídlosti a pomoci paní sekretářky *Evy Mattušové*.

Na závěr bych chtěla poděkovat mým *rodičům, babičce, Rád'ovi* a *Basharovi* za podporu, pomoc a citovou náklonnost během celého studia.

Tato práce byla finančně podpořena výzkumným záměrem MSM No. 0021620814, ESPE research fellowship sponzorovaným firmou Novo Nordisk a Fondem mobility Univerzity Karlovy v Praze.

V Praze, červen 2007

Autor: MUDr. Irena Hainerová

Adresa: Klinika dětí a dorostu UK-3.LF a FNKV, Šrobárova 50, 100 34 Praha 10

E-mail: ihainer@hotmail.com

Tel: +420 267 162 561

Školitel: prof. MUDr. Jan Lebl, Csc.

OBSAH	strana
1. <u>Souhrn</u>	5
2. <u>Úvod</u>	7
2.1. Obezita na podkladě genetických poruch	8
2.2. Principy řízení energetické homeostázy na úrovni CNS	10
2.3. Leptino-melanokortinová dráha regulace energetické bilance	10
2.4. Přínos studií na laboratorních modelech k výzkumu obezity	12
2.5. Monogenní formy obezity	15
2.5.1. Leptin	15
2.5.2. Leptinový receptor	16
2.5.3. Proopiomelanokortin	18
2.5.4. Prohormon konvertáza 1	18
2.5.5. Melanokortinový receptor 4. typu	19
2.5.6. Raritní případy monogenních forem obezity	19
2.6. Genová mapa lidské obezity	20
2.7. Metodika	21
2.7.1. Izolace DNA	21
2.7.2. Polymerázová řetězová reakce	21
2.7.3. Gelová elektroforéza	22
2.7.4. Přímá sekvenace	22
2.7.5. Denaturační vysokoúčinná kapalinová chromatografie	23
3. <u>STUDIE 1 (MC4R)</u>	
3.1. Úvod	25
3.1.1. Centrální melanokortinová osa	25
3.1.2. Varianty MC4R genu	26
3.2. Výsledky – článek	30
4. <u>STUDIE 2 (NMU)</u>	
4.1. Úvod	31
4.2. Výsledky – článek	32

5. <u>STUDIE 3 (GHSR)</u>	
5.1. Úvod	33
5.1.1. Ghrelin	33
5.1.2. Growth hormone secretagogue receptor	34
5.2. Výsledky – článek	35
6. <u>STUDIE 4 (PPAR-α)</u>	
6.1. Úvod	36
6.2. Výsledky – článek	37
7. <u>Závěrečný komentář</u>	38
8. <u>Appendices</u>	
8.1. Appendix A – Obecná metodika	39
8.2. Appendix B – Charakteristika vyšetřovaných skupin pacientů a kontrol	40
8.3. Appendix C – Protokoly jednotlivých studií	41
8.4. Appendix D – Užitečné webové stránky	44
9. <u>Souhrn v anglickém jazyce</u>	45
10. <u>Literatura</u>	48
11. <u>Seznam použitých zkratk</u>	61
12. <u>Přehled vlastních publikací a odborných ocenění</u>	
12.1. Původní články v časopisech s faktorem impaktu	63
12.2. Přehledové články v časopisech bez faktoru impaktu	63
12.3. Kapitoly v monografiích	63
12.4. Publikace v recenzním řízení	64
12.5. Přednášky, postery, abstrakta	64
12.6. Odborná ocenění	66
13. <u>Přílohy</u>	67

1. SOUHRN

Cílem předkládané dizertační práce bylo přispět k objasnění etiologie časně vzniklé obezity u dětí. Pandemie obezity v posledním desetiletí vedla k nárůstu počtu studií zabývajících se problematikou obezity. Intenzivní výzkum obezity přinesl objevy několika genů, jejichž mutace vedou ke vzniku těžké obezity bez významného přispění dalších faktorů. Obezita způsobená mutací jednoho genu se označuje jako monogenní typ obezity. Produkty genů, jejichž mutace vedou k časnému vzniku obezity, jsou součástí komplexního systému regulací energetické bilance. Nositelé mutací většinou nemají kromě těžké obezity vzniklé v raném dětství žádné další charakteristické znaky.

Mutace genů pro leptin, leptinový receptor, proopiomelanokortin, prohormon konvertázu 1, melanokortinový receptor 3. typu a melanokortinový receptor 4. typu narušují přirozenou humorální signalizaci mezi periferními tkáněmi a hypothalamickými centry sytosti a hladu. Defekty ve všech uvedených genech jsou spojeny s poruchou jídelního chování ve smyslu přejídání a s následným rozvojem těžké obezity v časném dětství. Mutace genu pro melanokortinový receptor 4. typu představují nejčastější příčinu monogenní obezity, neboť prevalence jejich výskytu u osob s časně vzniklou obezitou činí v některých populacích až 6 %. Ostatní monogenně podmíněné formy obezity se vyskytují sporadicky.

V této práci (**STUDIE 1**) jsme zkoumali prevalenci mutací genu pro melanokortinový receptor 4. typu (MC4R) v souboru téměř 300 dětí s časně vzniklou obezitou. Analyzovali jsme kódující oblast tohoto genu a identifikovali jsme 7 nositelů mutací. Z nich u jednoho se jednalo o novou, dosud nepopsanou mutaci, a jeden chlapec nesl mutaci genu v homozygotním stavu. V rámci fenotypické analýzy jsme porovnali vývoj tělesné hmotnosti mezi heterozygotními resp. homozygotními nositeli mutace a mezi obézními osobami, které mutaci nenesly. Z výsledků vyplynulo, že fenotypicky nelze odlišit nositele mutace MC4R od osob, které mutaci nemají. Pouze homozygotní nositel se vyznačoval časným vznikem velmi těžké obezity. Zjistili jsme povzbudivou skutečnost, že nositelé mutace jsou při redukčním režimu schopni dosáhnout srovnatelného úbytku tělesné hmotnosti jako ti, kteří mutaci nemají. Funkční analýza nové varianty tohoto genu odhalila sníženou funkci receptoru. Závěrem lze říci, že prevalence mutací MC4R genu ve zkoumané populaci českých dětí s časně vzniklou obezitou činila 2,4 %.

STUDIE 2 byla věnována prvnímu skríninku mutací a variant genu pro neuromedin U (NMU) u lidí. NMU hraje roli v regulaci energetické bilance, jak ukázaly studie prováděné na myších modelech. Myši se zcela nefunkčním NMU genem vykazují nárůst tělesné hmotnosti, snížený energetický výdej a rozvoj obezity. Provedli jsme genetickou analýzu kódující oblasti NMU genu a hledali jsme varianty u téměř 300 českých obézních dětí a 84 dánských dospělých obézních jedinců. Identifikovali jsme nový polymorfismus a raritní variantu u jednoho českého probanda. Polymorfismus byl genotypizován v obecné dánské populaci (n=5851) a bylo prokázáno, že námi zjištěná varianta je spojena s nadváhou a obezitou. Raritní varianta kosegredovala v rodině probanda s časným vznikem obezity.

Ve **STUDII 3** jsme se zabývali genem kódujícím receptor pro sekretagogy růstového hormonu; growth hormone secretagogue receptor (GHSR). Odhalili jsme dva nepříbuzní jedince s mutací v oblasti promotorové oblasti tohoto genu. Tato varianta v jedné rodině zcela kosegredovala s obezitou. Genotypizace 6365 dánských jedinců ukázala, že tato varianta není asociována s obezitou. Zdá se, že námi objevená raritní varianta, která mění funkci genu, může v některých rodinách zvýšit riziko vzniku obezity.

Výsledky skríninku polymorfismu Leu162Val v genu pro peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR α) jsou popsány ve **STUDII 4**. Studie se uskutečnila jednak ve skupině osob s diabetem 2. typu a jednak ve skupině jedinců s dyslipidemií. Obě skupiny a jejich genotyp byl srovnáván se skupinami kontrol. Zjistili jsme, že polymorfismus Leu162Val nesouvisí s výskytem diabetu či obezity. Na druhé straně, homozygotní nositelé tohoto polymorfismu mají vyšší hladiny triacylglyceridů a cholesterolu. Lze říci, že varianta Val162Val je spojena s vyššími hladinami lipidů.

Tři články, které byly již publikovány v mezinárodně uznávaných časopisech s faktorem impaktu, se týkají problematiky obezity a jsou zahrnuty v této práci. Další článek je tč. v recenzím řízení v časopisu s impakt faktorem. Tato práce zároveň předkládá přehledové články, věnované monogenním formám obezity, na jejichž vzniku jsem se podílela během svého studia.

Závěrem lze konstatovat, že výsledky provedených studií přispěly k porozumění patofyziologickým mechanismům vzniku obezity.

2. ÚVOD

Obezita je multifaktoriálně podmíněná metabolická porucha charakterizovaná zmnožením tělesného tuku. Je důsledkem interakce genetických dispozic s faktory zevního prostředí. Celosvětový nárůst prevalence obezity je dán jednak změnami stravovacích návyků, a to zejména zvýšenou spotřebou potravin s vysokou energetickou densitou a vysokým podílem tuků a jednoduchých sacharidů, jednak poklesem pohybové aktivity. Zpráva International Obesity Task Force pro Světovou zdravotnickou organizaci z roku 2004 uvádí, že na celém světě asi 10 % dětí a dospívajících má ve věku mezi 5 a 17 roky nadváhu a 2 – 3 % jsou obézní (Stettler 2004). Obezita v dětském věku předurčuje jedince k obezitě v dospělosti a v důsledku toho stoupá riziko předčasné nemoci a úmrtnosti vlivem komplikací obezity.

Regulace tělesné hmotnosti je zajištěna fyziologickými procesy, jejichž mechanismy nejsou dosud zcela objasněny. Nicméně pandemie obezity vedla v posledních desetiletích k intenzivnímu výzkumu fyziologie a patofyziologie řízení energetické rovnováhy a jídelního chování. Identifikace nových regulačních cest a následně jedinců s genovými mutacemi podílejícími se na regulaci energetické rovnováhy potvrzuje nezanedbatelný vliv genetických faktorů v rozvoji obezity.

Obezita je výsledkem **interakce faktorů prostředí a faktorů genetických**, jak již v posledních dvaceti letech ukázala řada studií. Ve 40 - 70 % jsou změny tělesné hmotnosti determinovány faktory genetickými. Genetické vlohy mohou buď tendenci ke vzniku obezity posilovat (tzv. **obezigenní geny**) nebo naopak před ní chránit (tzv. **leptogenní geny**).

V patofyziologii běžných forem obezity se především uplatňuje **dědičnost polygenní**, u které se na vzniku obezity podílí několik genových variant v interakci s prostředím. Mezi geneticky determinované faktory ovlivňující rozvoj obezity patří například přirozená regulace energetického příjmu, preference potravin, regulace energetického výdeje a regulace úrovně utilizace živin.

Ukazuje se, že někteří jedinci, kteří jsou nositeli určitých variant, jsou náchylní (**genetická predispozice**) ke vzniku obezity zejména v interakci s tzv. obezigenním prostředím, které v nárůstu obezity během posledních desetiletí hrálo klíčovou roli. Došlo ke změně způsobu stravování, ke zvýšení množství konzumované potravy a ke snížení pohybové aktivity (zejména spontánní). To vše přispívá k pozitivní energetické bilanci. "Toxické" (obezigenní) prostředí ovlivňuje expresi řady genů, které se podílejí na regulaci energetické bilance.

Lidstvo není proti vzniku obezity chráněno, protože v evoluci lidský genom spíše podporoval akumulaci tukové tkáně a bránil jejímu odbourávání s cílem zachovat šanci na přežití. Proto signály nasycení jsou slabší než signály hladu. Tato teorie se označuje jako "**thrifty genotype hypothesis**" (teorie úsporného genotypu). V době hladomorů v průběhu dějin lidstva došlo k vyselektování populace s úspornými variantami genů, neboť jedinci bez úsporných variant genů vymřeli (Neel 1962).

Lidský genom v éře všeobecné dostupnosti potravy není schopen adekvátně reagovat a i v obezigenním prostředí podporuje zachování a hromadění energetických zásob. Změna prostředí a chování jedinců tudíž vysvětluje nárůst prevalence obezity v posledních letech. Nicméně je zajímavé, že k nárůstu tělesné hmotnosti nedochází rovnoměrně v celé populaci, ale že k ještě většímu nárůstu hmotnosti inklinují jedinci již s nadváhou či obezitou. I tato skutečnost potvrzuje existenci genetických znaků podporujících rozvoj obezity.

Řada studií potvrdila existenci určitých skupin **geneticky predisponovaných ke vzniku obezity**, mezi které například patří indiáni kmene Pima v Arizoně, obyvatelé některých ostrovů v Pacifiku či Hispánci a Afroameričané v USA (Cossrow 2004). Na druhé straně, indiáni kmene Pima žijící v Mexiku v leptogenním (energeticky restriktivním) prostředí nejsou na rozdíl od arizonských Pima indiánů obézní a nemají vysoký výskyt diabetu 2. typu (Ravussin 1994).

2.1. Obezita na podkladě genetických poruch

Onemocnění na podkladě genetických poruch se manifestují nezávisle na prostředí. Řadíme k nim jednak mendelovsky děděné syndromy s obezitou jako jedním z fenotypických projevů komplexního onemocnění, jednak mutace genů ovlivňující energetickou bilanci, kde obezita je jediným nebo hlavním klinickým projevem. Dosud bylo identifikováno přibližně 50 lokusů spojených se vznikem **genetických syndromů s mendelovskou dědičností** a obezitou (syndromy Bardeta-Biedla, Pradera-Williho, Cohena a další) (Rankinen 2006).

V klinickém obraze těchto syndromů se ***kromě obezity často vyskytuje mentální retardace, dysmorfie a orgánově specifické vývojové vady***. Dědičnost těchto syndromů je jak autosomální, tak vázaná na X-chromosom. U většiny z nich byly identifikovány geny resp. chromosomální oblasti spojené se vznikem syndromu, avšak dosud se nepodařilo najít spojitost mezi molekulární poruchou a fenotypickým projevem. Ve většině případů je produktem mutovaného genu intracelulární protein, který se exprimuje v celém těle a jehož funkce dosud není jasná. K objasnění patofyziologie genových produktů je nezbytné řádně charakterizovat nositele mutace, a tím objasnit vznik onemocnění.

V průběhu posledních deseti let se však podařilo odhalit několik genů, jejichž mutace mají potenciál vyvolat těžkou obezitu bez významného přispění dalších genů či faktorů zevního prostředí. Tak byly objeveny případy **monogenní obezity** způsobené např. mutacemi genů kódujících hormony resp. neuropeptidy a jejich receptory, které jsou přímo zapojeny do systému regulace příjmu potravy a jídelního chování na úrovni centrálního nervového systému (CNS).

Z výzkumného hlediska jsou tyto případy při současné úrovni biomedicínského poznání mnohem snadněji detekovatelné, i když tvoří pouze malou část všech případů obezity. Jejich zkoumání přispívá k objevení nových dosud neznámých patofyziologických procesů v regulaci energetické bilance. Vyznačují se časným vznikem obezity a obvykle i vysokým stupněm závažnosti. Nejčastější příčinou obezity na podkladě mutace jednoho genu je mutace melanokortinového receptoru 4. typu (MC4R), kterou lze zjistit až u 5,8 % všech případů těžké obezity vzniklé v časném dětství (**STUDIE 1**).

Podstatně častěji se na vzniku obezity podílí několik genových variant (**polygenní forma**) v interakci s prostředím. Tyto geny a jejich varianty se uplatňují v regulaci energetického příjmu, jídelního chování a energetického výdeje. Genetická analýza komplexních chorob je zaměřena na výzkum kandidátních genů a na celogenomové mapování. Výzkum kandidátních genů se provádí *asociačními* a *vazebnými studii* (association, linkage studies) a zkoumají se geny, kde se předpokládá vliv na patogenezi onemocnění.

Výzkum se provádí na známých genech nebo na genech s biologickou funkcí, které byly objeveny vazebnou analýzou, expresivními studii, pozičním klonováním či studii na zvířecích modelech. Cílem je najít souvislost mezi variantami kandidátního genu a určitým fenotypickým projevem. S přibývajícím množstvím studií se ukazuje, že výsledky vlivu jednoho studovaného genu jsou často rozporuplné, což může být dáno jak genetickou variabilitou sledovaných populací tak i variabilitou prostředí, které výrazně ovlivňuje expresi genů.

Ke snadnější identifikaci nových kandidátních genů je třeba navyšovat statistickou sílu studií posílením počtu zkoumaných jedinců, jejich podrobným fenotypickým popisem, použitím extrémních případů a vyloučením stratifikace (přítomnosti různých podskupin v rámci studované skupiny – např. etnickou či genetickou variabilitou).

2.2. Principy řízení energetické homeostázy na úrovni CNS (Obr. 1)

Energetické zásoby se za fyziologických podmínek udržují relativně konstantně. Energetickou homeostázu zajišťuje komplexní interakce periferních signálů s CNS. Příjem potravy je řízen **centrem sytosti a hladu** ve ventromediálním (VMH) a laterálním hypothalamu (LH). Tato centra neuronů přijímají **humorální signály z tukové tkáně** (leptin) a z **gastrointestinálního traktu** (cholecystokinin, ghrelin, obestatin, peptid YY₃₋₃₆, inzulin, oxyntomodulin, glucagon-like peptide 1), **metabolické signály** (glykémie, hladiny aminokyselin a ketolátek) a **aferentní neurogenní signály** z gastrointestinálního traktu (např. distenze žaludku zprostředkovaná signály bloudivého nervu).

V CNS v oblasti nucleus arcuatus (ARC) existují dva typy neuronů - orexigenní a anorexigenní. **Orexigenní neurony** zprostředkují signalizaci pomocí neuropeptidu Y (NPY) a agouti-related peptidu (AgRP). Jejich aktivací dochází ke zvýšení energetického příjmu a ke snížení energetického výdeje. **Anorexigenní signalizaci** zajišťuje proopiomelanokortin (POMC) a cocaine-amphetamine related transcript (CART). Jejich aktivací dochází k poklesu energetického příjmu a ke zvýšení energetického výdeje. Oba typy neuronů předávají informaci o stavu tělesných zásob neuronům v oblasti hypothalamu, které též dostávají informace prostřednictvím adrenergických, dopaminergních, serotoninergních a endokanabinoidních signálů. Tyto neurony exprimují Y1 receptory (Y1R) a melanokortinové receptory 4. typu (MC4R). Orexigenní neurony předávají svoji informaci do LH (centrum hladu) a aktivací orexigenních působků (melanin koncentrující hormon – MCH, orexiny A, B) stimulují příjem potravy. Naopak anorexigenní neurony informují oblast VMH (centrum sytosti), a tím dochází k aktivaci anorexigenních působků (thyrotropin uvolňující hormon – TRH, kortikoliberin – CRH, oxytocin). Výsledkem této aktivace je navození pocitu sytosti a zvýšení energetického výdeje.

Energetický výdej je ovlivněn nejen TRH, ale i POMC, jehož neurony zasahují i do oblasti sympatického nervového systému, který aktivuje beta-adrenergní receptory. Vzhledem k tomu, že většina popsaných mutací narušuje signalizaci zprostředkovanou leptinem, zaměříme se na tuto regulační dráhu podrobněji.

2.3. Leptino-melanokortinová dráha regulace energetické bilance (Obr. 1)

Leptin je produkován zejména adipocyty. Přináší signály o stavu výživy do CNS prostřednictvím vazby na leptinové receptory (LEPR), které jsou přítomny v ARC v hypothalamu. Po navázání **leptinu na receptor** následně dochází ke stimulaci osy anorexigenních neuropeptidů a k inhibici osy orexigenních neuropeptidů (viz. výše).

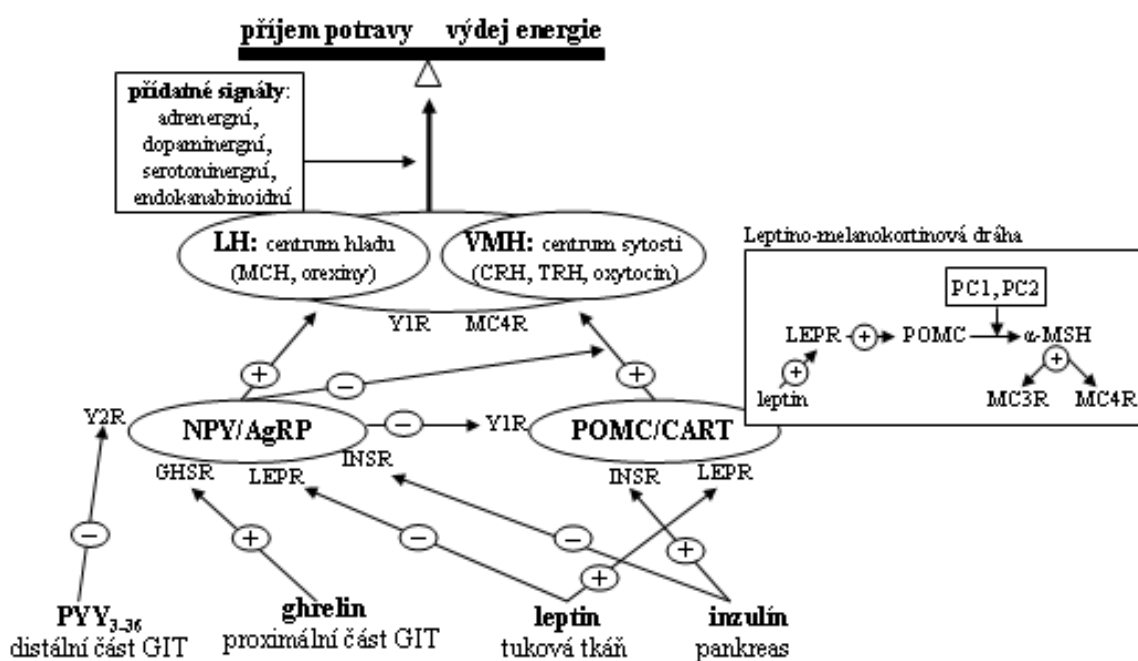
Stimulovaný polypeptid **POMC** se pod vlivem enzymů prohormon konvertázy 1 a 2 (**PC1, PC2**) štěpí na několik funkčních peptidů – tři formy hormonu stimulujícího melanocyty (alfa-MSH, beta-MSH a gama-MSH), adrenokortikotropní hormon (ACTH), beta- a gama-lipotropin a beta-endorfin.

Alfa-MSH svojí vazbou na melanokortinový receptor 3. typu (**MC3R**) a 4. typu (**MC4R**) aktivuje anorexigenní působky a tím vyvolá snížení příjmu potravy a zvýšení energetického výdeje. Současně leptin inhibuje neurony s orexigenním působením (NPY, AgRP, MCH, orexiny) a tím potlačuje jejich vliv na zvýšený příjem potravy a snížený energetický výdej. Konečným důsledkem vlivu leptinu na CNS je **snížení příjmu potravy a zvýšení energetického výdeje**.

Zásadní význam jednotlivých genů orexigenní či anorexigenní osy byl prokázán nejen v experimentech na myších modelech, ale i u konkrétních obézních pacientů. V souvislosti s časně nastupující monogenně podmíněnou obezitou byly popsány mutace genu pro leptin (LEP), LEPR, POMC, PC1, MC3R a MC4R.

V této souvislosti je zřejmé, že **hypothalamický melanokortinový systém** představuje jeden z nejkompexnějších systémů v endokrinologii člověka, jelikož se podílí nejen na regulaci energetického příjmu a energetického výdeje, ale ovlivňuje i pigmentaci (alfa-MSH) a funkci některých endokrinních žláz.

Obr. 1 Řízení energetické bilance - interakce periferie s centrálním nervovým systémem (upraveno podle Bell 2005, Gale 2004)



Neurony NPY/AgRP (orexigenní) a POMC/CART (anorexigenní) v ARC hypothalamu hrají klíčovou roli v regulaci energetické bilance. Aktivace orexigenních neuronů stimuluje příjem jídla, naopak aktivace anorexigenních neuronů příjem potravy potlačuje. Tyto dva typy neuronů přijímají mnoho signálů z periferie. Leptin a inzulín svým působením v CNS aktivují anorexigenní neurony a inhibují neurony orexigenní. Ghrelin orexigenní neurony aktivuje, PYY₃₋₃₆ je naopak inhibuje. Orexigenní neurony potlačují funkci neuronů anorexigenních prostřednictvím Y1R. Signály obou typů neuronů aktivací či inhibicí receptorů (MC4R, Y1R) ovlivňují neurony v hypothalamických centrech sytosti (VMH) a centrech hladu (LH). Tyto neurony společně s přídatnými signály (adrenergními, dopaminergními, serotoninergními, endokanabinoidními) regulují příjem potravy a výdej energie.

AgRP, agouti-related peptid; CART, cocaine-amphetamine related transcript; CRH, hormon uvolňující kortikotropin; GHSR, growth hormone secretagogue receptor; GIT, gastrointestinální trakt; INSR, receptor inzulínu; LEPR, leptinový receptor; LH, laterální hypothalamus; MCH, melanin koncentrující hormon; MC3R, melanokortinový receptor 3. typu; MC4R, melanokortinový receptor 4. typu; MSH, melanocyty stimulující hormon; NPY, neuropeptid Y; PC1, prohormon konvertáza 1; PC2, prohormon konvertáza 2; POMC, proopiomelanokortin; PYY₃₋₃₆, peptid YY₃₋₃₆; TRH, thyrotropin uvolňující hormon; VMH, ventromediální hypothalamus; Y1R, receptor Y1; Y2R, receptor Y2.

2.4. Přínos studií na laboratorních modelech k výzkumu obezity

K identifikaci genů asociovaných s obezitou velkou měrou přispěly myší modely obezity. Tyto modely se uplatňují jak v monogenních formách, tak i u polygenních forem obezity. Zvířecí modely se získávají spontánně vzniklými mutacemi (fat, ob, db, tub) nebo genetickým zásahem do jejich genotypu - tzv. **transgenní zvířata** (agouti). U **knock-out** (KO) myších modelů je gen zcela vyřazen z funkce. Oproti tomu existují myší modely, kde se exprese genu posiluje (agouti, beta1-adrenergní receptor a další). Studium fenotypu těchto myších modelů je možné zjistit funkci sledovaného genu.

Mnoho myších modelů monogenní obezity je známo déle než 40 let. Avšak až v posledním desetiletí došlo k objasnění molekulární podstaty a patofyziologických mechanismů jejich obezity. Na základě těchto modelů byly následně objeveny první monogenně podmíněné formy obezity u člověka (Chen 1999). Velmi často se ***klinický obraz lidských jedinců se stejným defektem podobá obrazu myších modelů***. Uvedme alespoň nejznámější myší modely (Tab. 1):

obese (ob/ob) - model mutace LEP genu se dědí autosomálně recesivně a klinický obraz je velmi podobný fenotypu člověka s defektem LEP genu. Myši s touto mutací mají časně

vzniklou obezitou, hyperfagii, nulové hladiny leptinu, jsou neplodné a méně rostou. Substituce leptinem je velmi účinná (Coleman 1978, Halaas 1995, Pellemounter 1995).

diabetes (db/db)- model mutace LEPR genu je též autosomálně recesivně podmíněný. Mezi klinické projevy spojené s touto mutací patří časný vznik obezity, hyperfagie, diabetes mellitus, hypotermie, snížené hladiny kortizolu, menší vzrůst a neplodnost (Coleman 1978, Chen 1996, Chua 1996).

fat (fa/fa) – u myších modelů se jedná o mutaci genu pro karboxypeptidázu E (u člověka tomu odpovídá mutace PC1 genu). Důsledkem je porucha štěpení řady prohormonů a proneuropeptidů. Projevuje se později nastupující obezitou, hyperproinzulinémií, přechodnou hyperglykémií a neplodností. Dědí se autosomálně recesivně (Coleman 1990, Cool 1997, Naggert 1995).

agouti - je prvním klonovaným genem obezity (transgenní model). Potlačuje vznik POMC a navázání alfa-MSH na melanokortinové receptory (zejména melanokortinový receptor 1. typu (MC1R) a 4. typu (MC4R)). Myši s touto mutací mají žluté zbarvení srsti, obezitu, hyperfagii, zvýšenou hladinu inzulínu a hyperglykémií. Monogenní mutace tohoto genu zatím u lidí nebyly popsány, jsou známy pouze nukleotidové varianty (Graham 1997, Michaud 1994, Miller 1993).

mc4r - myši s mutací tohoto hypothalamického receptoru jsou obézní, více rostou, trpí hyperfagií, mají hyperinzulinémií a hyperleptinémií; u samců je popisována hyperglykémie. Dále vykazují sníženou pohybovou aktivitu a leptinovou rezistenci. Obdobné klinické znaky nacházíme u člověka zejména při homozygotní mutaci *MC4R* (Butler 2001, Chen 2000b).

Jak již bylo řečeno, myší modely jsou velmi užitečné při zjišťování role mutace nově objeveného genu. Cíleným zásahem do genotypu myši (transgenní myš) se následně zjišťuje funkce genu a role jeho produktu v patogenezi obezity. Výhoda zvířecích modelů také spočívá v možnosti cíleného studia specifického fenotypického znaku (např. energetického výdeje) jednak odbouráním vlivu prostředí a jednak možností kontrolovaně ovlivňovat různé faktory (např. množství přijímané potravy).

Tab. 1. Myší modely monogenní obezity

Myší model	Fenotyp	Dědičnost	Myší chromosom	Lidský chromosom
<i>obese (ob/ob)</i>	Časný vznik obezity, hyperfagie, hypoleptinémie, diabetes, hypotermie, hypokortikosteronémie, menší vzrůst, neplodnost, příznivá odpověď na podávání leptinu	Recesivní	6 10.5 cM	7q31.3
<i>diabetes (db/db)</i>	Časný vznik obezity, hyperfagie, diabetes, hypotermie, hypokortikosteronémie, menší vzrůst, neplodnost	Recesivní	4 46.7 cM	1p31
<i>fat (fa/fa)</i>	Pozdní nástup obezity, hyperproinzulinémie, tranzitorní hyperglykémie, neplodnost	Recesivní	8 32.6 cM	4q32.3
<i>agouti (A^v)</i>	Světlé (žluté) zbarvení srsti, obezita, hyperfagie, hyperinzulinémie, hyperglykémie	Dominantní	8 D1-D2	16q22
<i>mc4r</i>	Obezita, zvýšené růstové tempo, hyperfagie, hyperinzulinémie, hyperglykémie (pouze u samců), hyperleptinémie, snížená pohybová aktivita, leptinová rezistence, nezměněná termogeneze při příjmu tuků	Kodominance	18 E1	18q22

Obese, mutace v genu pro leptin; *diabetes*, mutace v genu pro leptinový receptor; *fat*, mutace genu pro karboxypeptidázu E (hlodavci) či prohormon konvertázu 1 (lidé). Myší modely - *obese*, *diabetes*, *fat* a *agouti* jsou přirozeně se vyskytující modely obezity, oproti *mc4r* modelu, který je výsledkem genové manipulace.

2.5. MONOGENNÍ FORMY OBEZITY

Díky studiím provedeným na myších modelech a následně na osobách s morbidní obezitou byla identifikována řada genů, které ovlivňují řízení jídelního chování a výdeje energie. Výsledkem mutací těchto genů je obvykle těžká obezita vznikající v útlém věku. Přestože tyto mutace jsou velmi vzácné, jejich identifikace nám umožňuje objasnit dosud neznámé patofyziologické procesy ovlivňující energetickou bilanci.

Dnes je známo nejméně 11 genů, u nichž je mutace jednoho genu příčinou vzniku monogenní formy obezity (Rankinen 2006). Mutace genů pro LEP, LEPR a POMC jsou vyjímečné svojí úplnou penetrancí a autosomálně recesivní dědičností. Tyto mutace vedou k těžké obezitě již v prvních měsících života, k hyperfagii, hypogonadotropnímu hypogonadismu a centrální hypotyreóze.

2.5.1. LEPTIN (LEP)

Objev leptinu (z řeckého slova leptos - štíhlý) vedl k částečnému objasnění regulace energetické bilance na úrovni CNS. Sekrece leptinu do krevního řečiště závisí na množství tukové tkáně a probíhá nejen v bílé a hnědé tukové tkáni, ale v menší míře i v mozku, v placentě, ve fetálním srdci, v kostech, v chrupavce, ve vlasových folikulech, v žaludku a v epitelu prsní žlázy. **Fyziologickou úlohou leptinu je regulace energetického příjmu a výdeje prostřednictvím LEPR a melanokortinové cesty v CNS** (Fisher 1999).

Leptin má vliv i na reprodukční osu zvýšením sekrece gonadoliberinu, reguluje buňky imunitního systému, beta-buňky pankreatu, buňky svalové a také se podílí na regulaci krevtvorby. Leptin stimuluje sympatický nervový systém a tím ovlivňuje termogenezi. Podílí se na regulaci funkce nadledvin a štítné žlázy (Moran 2003). Jak již bylo zmíněno, regulaci příjmu potravy zajišťuje leptin cestou stimulace sekrece anorexigenních peptidů (POMC, CART) a inhibicí sekrece orexigenních peptidů (NPY, AgRP) prostřednictvím svého receptoru v ARC hypothalamu.

Mutace genu pro LEP byly dosud popsány ojediněle. První mutace byla nalezena u dvou velmi obézních dětí v roce 1997 (Montague 1997). Dominovala u nich časná těžká obezita – jedno z nich vážilo ve 2,5 letech 30 kg, druhé v 9 letech 96 kg (Montague 1997). Porodní hmotnost u dětí s mutací leptinového genu je normální, avšak od prvních měsíců života začíná docházet k enormnímu nárůstu hmotnosti (O'Rahilly 2002). Klinický obraz u lidí je nápadně podobný fenotypu popisovaného u myších modelů (Tab. 1).

Jedinci s mutací LEP mají **hyperfagii, hypogonadismus a opožděný nástup puberty** (začátek dospívání mezi 20. - 30. rokem) (Gibson 2004, Montague 1997, Ozata 1999, Strobel

1998, Zhang 1994). V laboratorním nálezu dominují velmi nízké až nulové hladiny leptinu (Karvonen 1998), jinak je laboratorní nález nenápadný. Jen ojediněle byla popsána hyperinzulinémie spojená s mírnou hyperglykemií. Obezita omezuje postižené děti již ve velmi časném věku v pohybu. Je popsán případ dítěte, které ve věku 2 let nebylo pro obezitu schopno chůze, a proto podstoupilo liposukci stehen. Ta nevedla ke dlouhodobému zlepšení a postižené dítě skončilo ve 4 letech na invalidním vozíku jako zcela imobilní.

Hyperfagie u mutace LEP je velmi nápadná. Nedostupnost potravy vede děti až k agresivnímu chování, které se podobá chování dětí se syndromem Pradera-Williho (PWS). Děti se dobývají do ledniček a jsou schopny konzumovat například zmražené maso. Všichni popsaní nositelé mutace genu pro leptin jsou **homozygoti**. Heterozygotní nositelé mutace v mladším věku jsou normosteničtí a pouze jen někteří starší heterozygotní příbuzní mají poněkud zvýšený obsah tělesného tuku a nižší hladiny leptinu.

Když v roce 1994 Friedmann se spolupracovníky objevil leptin, nahlíželo se na tento hormon jako na velmi slibný prostředek v boji proti obezitě. Následující roky byly věnovány intenzivnímu studiu regulace příjmu potravy na úrovni hypothalamu. Později se ukázalo, že většina obézních jedinců má vysoké hladiny leptinu v důsledku leptinové rezistence (Maffei 1995). Proto je aplikace rekombinantního leptinu u běžných forem obezity málo účinná či zcela bez efektu.

Na druhé straně, děti i dospělí s mutací LEP genu jsou dosud jediní, u kterých je možné účinně terapeuticky zasáhnout. Každodenní podávání rekombinantního leptinu je provázeno snížením hmotnosti na úroveň normostenika, vymizením hyperfagie, vzestupem gonadotropních hormonů a navozením puberty (Farooqi 1999, Farooqi 2002). U tří dospělých osob s deficitem leptinu byl po dobu 18 měsíců aplikován parenterálně leptin v dávce 0,01-0,04 mg/kg. Léčba vedla k poklesu BMI, ke snížení tělesného tuku, ke zvýšení fyzické aktivity a ke zlepšení jídelního chování (Licinio 2004).

Efekt rekombinantního leptinu lze dokumentovat na případě chlapce, jehož váha dosahovala ve 3 letech 42 kg. Po substituci leptinem došlo k výrazné redukci tělesné hmotnosti. Chlapec poté v 7 letech vážil 32 kg (O'Rahilly 2003). V jedné studii (O'Rahilly 2002) byl popsán vznik protilátek proti leptinu při jeho dlouhodobém podávání, avšak tyto protilátky neovlivnily jeho výrazný klinický efekt na redukci tělesné hmotnosti.

2.5.2. LEPTINOVÝ RECEPTOR (LEPR)

LEPR je jednoduchý transmembránový receptor ze skupiny cytokinových receptorů. Exprimuje se v řadě tkání. V hypothalamu je nezbytný pro leptinovou signalizaci (Chua 1996,

Lee 1996, Tartaglia 1995). Při mutaci LEPR genu dochází k narušení leptinové signalizace a následně k porušení energetické rovnováhy.

Defekty LEPR byly zatím popsány ojediněle. V klinickém obraze se u pacientů s defektem LEPR popisují velmi vysoké hladiny leptinu, **hyperfagie**, časně vzniklá obezita, chybění pubertálního vývoje a **infertilita** v důsledku hypogonadotropního hypogonadismu, centrální hypotyreóza, mírné růstové opoždění a nedostatečná odpověď sekrece růstového hormonu na hypoglykémii (Clément 1998, O'Rahilly 2002). Některé studie u těchto pacientů popisují sociální nepřizpůsobivost a emocionální labilitu, není však jasné, zda se nejedná o sekundární fenomény.

U heterozygotních rodičů či sourozenců těchto dětí je tělesná hmotnost normální či jen lehce zvýšená. Toto bylo dále potvrzeno metaanalýzou, která zkoumala tři jednonukleotidové polymorfismy LEPR - Lys109Arg, Gln223Arg a Lys656Asn v různých populacích a nenašla žádný vztah s indexem tělesné hmotnosti (BMI) či obvodem pasu (Heo 2001).

Tab. 2 Melanokortinové receptory (upraveno podle Abdel-Malek 2001)

	Chromosom	Místo exprese	Funkce	Lidský fenotyp
MC1R	16q24	Melanocyty, imunitní systém, endotel, Sertoliho buňky	Syntéza eumelaninu, protizánětlivá reakce	Rusé vlasy
MC2R	18p11.2	Nadledviny, adipocyty	Produkce glukokortikoidů	Familiární nedostatečnost glukokortikoidů
MC3R	20q13	Hypothalamus, thalamus, hippokampus, přední amygdala, kortex	Kardiovaskulární funkce, termogeneze a regulace chuti k jídlu	Monogenní obezita
MC4R	18q22	Centrální nervový systém	Regulace chuti k jídlu	Monogenní obezita
MC5R	18p11.2	Nadledviny, tukové buňky, ledviny, leukocyty, plíce, lymfatické uzliny, prsní žláza, ovaria, hypofýza, varlata, děloha a mozek	Není známo	BMI a množství tukové tkáně

2.5.3. PROOPIOMELANOKORTIN (POMC)

POMC je polypeptid, který se exprimuje nejen v ARC hypothalamu, ale i v placentě a v pankreatu (O'Donohue 1982). Exprese POMC je stimulována navázáním leptinu na leptinový receptor. POMC se následně štěpí na několik menších peptidů (ACTH, alfa-, beta- a gama-MSH, beta-endorfin, beta- a gama-lipotropin), z nichž některé jsou důležitými ligandy pro skupinu melanokortinových receptorů - MC1R, melanokortinový receptor 2. typu (MC2R), MC3R a MC4R (Whitfeld 1982). Navázáním na tyto receptory je stimulována **pigmentace** (vazbou **alfa-MSH na MC1R**), **sekrece kortizolu** (vazbou **ACTH na MC2R**) a ovlivňována energetická bilance na úrovni CNS (vazbou **alfa-MSH na MC3R a MC4R**) (Tab. 2).

Kompletní deficit POMC je u člověka velmi vzácný. V klinickém obraze dominuje **časný vznik obezity, hyperfagie, rusé vlasy a hypopigmentace** (v důsledku deficitu alfa-MSH), **deficit ACTH, hypokortizolémie** a velmi nízká až nulová hladina alfa-MSH (Krude 1998, Krude 2000, Krude 2003). U žádného z postižených dosud nebyly popsány fenotypické projevy deficitu beta-endorfinu.

Častěji nacházíme heterozygoty s mutací POMC, u kterých se v různé míře projevují příznaky typické pro homozygoty. Někteří mají fenotyp identický s homozygoty, u jiných nejsou charakteristické fenotypické známky přítomny (Challis 2002, Krude 2003, Miraglia 2001). Byla zjištěna řada běžných i méně častých variant POMC genu (Echwald 1999, Hinney 1998). Varianta Arg236Gly POMC genu zvyšuje pravděpodobnost vzniku obezity (Challis 2002).

Intranazální podávání ACTH4-10 nositelům mutace POMC nijak neovlivnilo obezitu (Krude 2003). Na druhé straně, několik heterozygotů s mutací v genu pro POMC podstoupilo redukční kúru po dobu jednoho roku. Výsledkem byla normalizace tělesné hmotnosti, úbytek tukové tkáně a snížení inzulínové rezistence. Z toho vyplývá povzbudivá zpráva, že mutace v tomto místě melanokortinové cesty nevyklučují úspěšnou redukci tělesné hmotnosti (Santoro 2006).

2.5.4. PROHORMON KONVERTÁZA 1 (PC1)

PC1 je enzym zodpovědný za proteolytické štěpení řady prohormonů (např. proinzulínu) a proneuropeptidů (např. POMC) (Benjannet 1991, Cool 1997, Cool 1998, Pritchard 2002, Zhou 1993). Mutace genu pro PC1 jsou velmi vzácné a vedou k těžké **časně nastupující obezitě navzdory malabsorpci**, k hypogonadotropnímu hypogonadismu, hypokortizolémii a abnormální glukózové toleranci, která je zřejmě způsobena chyběním

proteolytického štěpení proinzulínu. Vysoké hladiny proinzulínu a **velmi nízké hladiny inzulínu** jsou proto pro nositele těchto mutací charakteristické (Jackson 1997). Důvodem malabsorpce je porušená funkce proteáz, což potvrzují nálezy vysokých hladin progastrinu a proglukagonu.

2.5.5. MELANOKORTINOVÝ RECEPTOR 4.TYPU (MC4R)

O mutacích genu pro MC4R, které patří v rámci monogenních forem obezity k nejčastějším, je pojednáno ve **STUDII 1**.

2.5.6. RARITNÍ PŘÍPADY MONOGENNÍCH FOREM OBEZITY

V ojedinělých případech byly popsány mutace genu pro *receptory kortikoliberinu* (CRHR1 a CRHR2), genu pro *receptor melanin koncentrujícího hormonu* (MCHR1) a genu pro *transkripční faktor SIM1* (Single Minded Homologue 1). Mutace SIM1 byla popsána u dívky s časně vzniklou těžkou obezitou a hyperfagií. Zjistilo se, že pacientka je nositelkou balancované translokace mezi 1p22.1 a 6q16.2. Tato oblast je místem SIM1 genu, který kóduje transkripční faktor důležitý v neurogenезi (zejména paraventriculární oblasti hypothalamu). Nicméně jeho role v patogenezi obezity zatím není zcela objasněna. Klinický obraz připomíná projevy PWS (Holder 2000). Mutace genu NTRK2, který kóduje *receptor pro brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), se projevuje vedle časně vzniklé obezity hyperfagií, mentální retardací, poruchou krátkodobé paměti, opožděním vývoje řeči, stereotypním chováním a poruchou nocicepce (Yeo 2004).

V rámci melanokortinového systému se do centrální regulace energetické bilance zapojuje další ze sedmi transmembránových receptorů v hypothalamu. Jedná se o receptor ghrelinu a dalších látek stimulující sekreci růstového hormonu – growth hormone secretagogue receptor (**GHSR**) – **STUDIE 3**. Mezi významné kandidátní geny obezity se řadí neuromedin U (**NMU**), jehož úloha v regulaci energetické homeostázy byla před provedením našich studií doložena pouze na myších modelech. **STUDIE 2** ukázala, že NMU hraje roli v regulaci energetické bilanci i u člověka. **STUDIE 4** se zabývá variantami genu pro peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (**PPAR-alfa**) a jejich asociací se znaky obezity.

2.6. Genová mapa lidské obezity (Human Obesity Gene Map)

V roce 1994 prof. Bouchard založil databázi chromosomálních lokusů, genů a mutací, které jsou spojeny s fenotypickými projevy obezity. Tato **genová mapa lidské obezity** je každoročně aktualizována a publikována na stránkách Obesity Research a je k dispozici i v elektronické podobě (<http://obesitygene.pbrc.edu>).

Poslední aktualizace proběhla v roce 2005 a uvádí více jak 600 genů, markerů a chromosomálních oblastí spojených s obezitou (Rankinen 2006). Doposud bylo identifikováno 166 genů, jejichž porušená či nadměrná exprese u myších modelů ovlivňuje tělesnou hmotnost a složení tukové tkáně.

2.7. METODIKA

2.7.1. Izolace DNA (deoxyribonukleotidová kyselina)

DNA byla izolována z plně nesrážlivé krve pomocí QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

2.7.2. Polymerázová řetězová reakce (*polymerase chain reaction, PCR*)

Polymerázová řetězová reakce je metoda rychlého a snadného zmnožení definovaného úseku DNA. Proto se stala hlavní metodou molekulárně biologických laboratoří. Lze říci, že jde o napodobení *in vivo* replikace jaderné DNA. PCR využívá opakovaných cyklů syntézy DNA formou enzymatické replikace *in vitro*.

Obr. 2 Příklad přístroje k PCR reakci



Cílová sekvence, která se má replikovat, je vymezena dvěma oligonukleotidy (primery). Reakce využívá právě těchto dvou oligonukleotidových primerů, které hybridizují s protichůdnými vlákny DNA a od jejich 3'-konceů je zahájena syntéza komplementárních řetězců. Syntéza nových komplementárních vláken je katalyzována termostabilní DNA polymerázou (Taq DNA-polymeráza).

Opakování cyklů, které zahrnují denaturaci DNA templátů (denaturation), hybridizaci primerů (annealing) a syntézu komplementárních vláken DNA (extension), má za výsledek exponenciální nárůst počtu specifických DNA fragmentů. Konce fragmentů jsou určeny 5'-koncei primerů. Protože primery musí být chemicky syntetizovány, musíme znát alespoň počáteční a koncové sekvence amplifikovaného úseku. Obvykle se pro amplifikaci používá 30 až 40 cyklů, přičemž se v každém cyklu množství molekul oproti předcházejícímu cyklu zdvojnásobí.

Cyklické změny teplot reakční směsi lze řídit automatizovaně pomocí tzv. termocykleru (Obr. 2). Reakční směsi obsahují primery (forward a reverse), deoxyribonukleázový trifosfát (dNTP), DNA polymerázu, PCR pufr a $MgCl_2$.

Specifická reakce je daná výběrem primerů pro cílenou DNA sekvenci. Výběr primerů by měl splňovat některá doporučení:

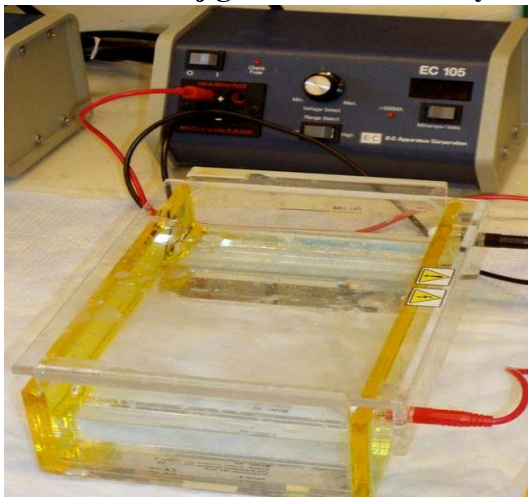
1. délka ~ 18 – 30 bp (zajištění specifity hybridizace)
2. množství GC by neměl přesáhnout 50 % (zabránění nízkých teplot tání)

K tomu, abychom použili optimální primery, existují k jejich výběru programy přístupné na internetu (např. program Primer 3 – <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi>). K optimalizaci polymerázové řetězové reakce se využívá změna: 1) annealing teploty, 2) koncentrace MgCl₂, 3) počet cyklů, 4) koncentrace DNA polymerázy.

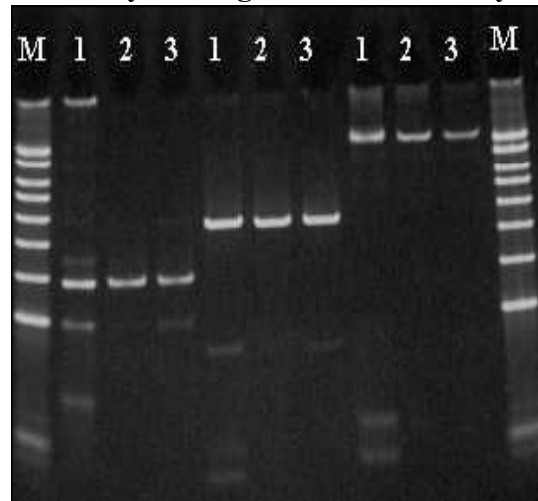
2.7.3. Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je v současnosti nejrozšířenější elektroforetickou metodou, při které se látky rozdělují na základě pohyblivosti v gelu. Této metodiky se využívá k vizualizaci amplifikovaných DNA fragmentů. Elektroforéza nutí migrovat negativně nabitou DNA k pozitivně nabitému konci (Obr. 3). Rychlost migrace závisí na délce fragmentu. Ethidium bromid, který se přidává do agarózového gelu, umožňuje vizualizaci DNA fragmentů v UV světle (Obr. 4). K určení délky DNA fragmentů se využívá DNA marker, který se přidává současně s amplifikovanými fragmenty DNA.

Obr. 3 Příklad přístroje gelové elektroforézy



Obr. 4 Výsledek gelové elektroforézy



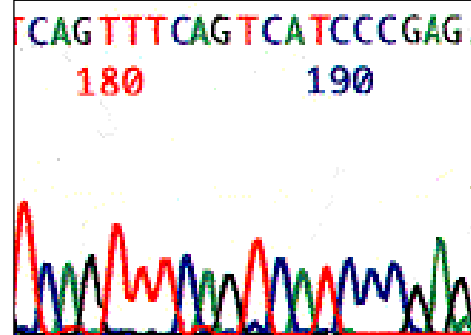
2.7.4. Přímá sekvenace

Přímá sekvenace je metoda k zjištění konkrétní sekvence vybraného úseku DNA řetězce. Řadí se mezi velmi citlivé metody k detekci mutací a variant DNA. Provádí se pomocí PCR a při vhodných podmínkách sekvenční PCR se syntetizují řetězce všech

možných velikostí. Do reakce se vloží produkt předchozí PCR, primer z jedné strany, pufr, polymeráza, mix normálních dNTP a značených ddNTP (dideoxyribonukleotidtrifosfát). Tyto nukleotidy (ddATP, ddCTP, ddGTP a ddTTP) nemají na 3' uhlíku ribosy OH skupinu, z čehož plyne, že na tento konec již nemůže být žádný další nukleotid navázán.

Reakce probíhá následovně: V reakční směsi je namnožena jednovláknová DNA, jejíž sekvenci chceme znát, DNA polymeráza, příslušné primery, dostatek deoxyribonukleotidtrifosfátů (dATP, dCTP, dGTP a dTTP) pro syntézu a ještě určité množství jednoho typu dideoxyribonukleotidtrifosfátu – např. ddATP. DNA polymeráza začne od nasednuvších primerů doplňovat sekvenci druhého vlákna. Pokaždé, když polymeráza doplňuje dATP do řetězce, je pravděpodobné, že namísto dATP použije ddATP. Při zařazení ddATP polymerace na tomto místě končí. Necháme-li tedy takovouto reakci proběhnout, získáme velké množství různě dlouhých oligonukleotidů, které budou všechny končit adeninem. Pokud stejná reakce proběhne s ddCTP či ddGTP či ddTTP, dostaneme 4 směsi oligonukleotidů, přičemž v každé směsi budou oligonukleotidy končit příslušnou bází.

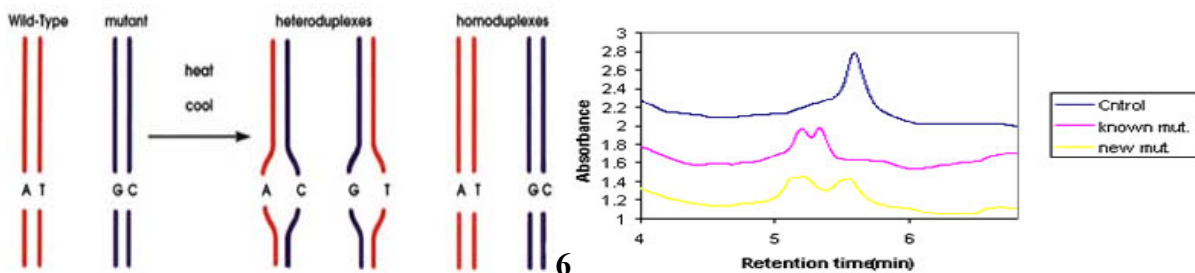
Obr. 5 Výsledek přímé sekvenace



2.7.5. Denaturační vysokoúčinná kapalinová chromatografie (*denaturing High Performance Liquid Chromatography, dHPLC*)

Principem této metody je formace heteroduplexů hybridizací zahřátím a následným zchlazením PCR produktů. Za částečně denaturujících podmínek (vyšší teplota) dochází k rozlišení homozygotních a heterozygotních vzorků. Tato metoda je vhodná k detekci heterozygotních variant a SNP alel, nicméně je nevhodná k detekci homozygotních mutací. Klasickým iontově-párovým činidlem v dHPLC je triethylammonium acetát (TEAA).

Obr. 6 Princip dHPLC (vysvětlení viz. text)



dHPLC je další metoda k detekci mutací v cílené oblasti DNA. Produkty polymerázové řetězové reakce (max. délky 600 bp) jsou zahřáty na 95°C, aby došlo k separaci

DNA řetězců. Následuje proces chlazení, při kterém dojde k vytvoření homo- či heteroduplexů (Obr. 6). V případě heterozygotních mutací ve vzorku DNA se vytvoří heteroduplex a homoduplex. V případě homozygotních mutací či vzorku bez mutace dojde k vytvoření pouze homoduplexů. Rozdíl vyjádřen tvarem výsledné křivky je mezi homo- a heteroduplexy nejzřetelnější při optimální teplotě (teplota pro danou DNA sekvenci je stanovena programem Wave MakerTM) (Obr. 6). K tomu, aby bylo možné identifikovat homozygotní variantu, je nezbytné smíchat daný vzorek se vzorkem bez mutace (wild-type), tak se vytvoří v případě původního homozygotního vzorku heteroduplex (použito ve **STUDII 2**). dHPLC analýza byla používána při skríninku genu pro NMU.

3. STUDIE 1 - MELANOKORTINOVÝ RECEPTOR 4. TYPU (MC4R)

3.1. ÚVOD

Centrální melanokortinový systém je klíčovou osou regulace příjmu potravy a MC4R je považován za nejdůležitější receptor tohoto systému. MC4R patří do rodiny melanokortinových receptorů (MCR), ke kterým se řadí celkem pět typů MCR (MC1R-MC5R) (Tab. 2) (Mountjoy 1992). Všech pět melanokortinových receptorů obsahuje sedm transmembránových úseků. Po aktivaci receptoru dochází k přenosu signálu ke G-proteinu, který následně aktivuje adenylátcyklázu (Chhajlani 1992, Tatro 1990). MCR jsou receptory melanokortinů, tedy strukturálně vzájemně podobných peptidů, které byly pojmenovány podle jejich melanotropní a kortikotropní aktivity. Řadíme k nim ACTH, alfa-MSH, beta-MSH a gama-MSH. Všechny vznikají štěpením molekuly POMC za účasti proteolytické aktivity PC1 a PC2. Mezi další štěpné produkty POMC patří β -endorfin a β -lipotropní hormon (Abdel-Malek 2001). Všechny melanokortiny obsahují funkčně velmi důležitý tetrapeptid His-Phe-Arg-Trp (Abdel-Malek 2001, Oosterom 1999).

MC4R byl klonován Gantzem se spolupracovníky v roce 1993 (Gantz 1993a, Gantz 1993b). Tento protein s 332 aminokyselinami je kódován genem s jediným exonem. Gen je lokalizován na chromozomu 18q22, tedy v oblasti, u které byla ve studii finských dvojčat prokázána asociace s obezitou u člověka (Gantz 1993b, Ohman 1999, Sundaramurty 1998). MC4R se exprimuje v mozku, zejména v centrech sytosti a hladu v hypothalamu.

3.1.1. Centrální melanokortinová osa

Leptin se přes hematoencefalickou bariéru dostává do CNS, kde působí na AgRP (inhibice) a POMC neurony (aktivace) (Kask 1998). Cílová místa NPY/AgRP a POMC neuronů jsou NPY1/5 receptory a MC4R v paraventriculární (PVN) a laterální oblasti hypothalamu (LH) (Spiegelman 2001). NPY1/5 a MC4R ovlivňují hladinu cylického 3', 5'-adenozin monofosfátu (cAMP) aktivací či inaktivací adenylátcyklázy, která se váže buď k Gs- nebo k Gi-proteinům (Cowley 1999). Adenylátcykláza tak reguluje hladinu cAMP a tudíž i výslednou činnost cílových neuronů (Cowley 1999).

Alfa-MSH je agonistou MC4R. Navázáním na receptor dochází ke zvýšení cAMP (Haskell-Luevano 2001, Mountjoy 1997, Srinivasan 2004). AgRP je nejen přímým antagonistou MC4R, ale potlačuje i účinek alfa-MSH, tudíž v obou případech dochází k potlačení účinků MC4R (Fong 1997, Haskell-Luevano 2001, Nijenhuis 2001, Ollmann

1997, Srinivasan 2004). Tato signalizace v PVN oblasti ovlivňuje hladiny CRH a TRH, které působí na autonomní nervový a endokrinní systém (Cowley 1999, Cummings 2003, Harris 2001). V LH jsou regulovány touto cestou orexiny a MCH, které ovlivňují příjem potravy (Spiegelman 2001).

U KO *mc3r* myších modelů nedochází k nárůstu hmotnosti, ale spíše jen ke zmnožení tukové tkáně při současně redukci netukové tkáně (Chen 2000a). KO *mc3r/mc4r* myší modely jsou ve srovnání s KO *mc4r* myšimi modely více obézní, neboť dochází ke ztrátě inhibičního efektu MC3R na POMC neurony (Chen 2000a, Huszar 1997). U lidí byla dosud popsána jen jediná patogenní mutace *MC3R*, Ile183Asn (Lee 2002). Důsledkem této mutace dochází ke snížení signalizační aktivity MC3R a ke vzniku obezity. I dvě další popsané varianty mají vztah ke znakům obezity (Boucher 2002, Lee 2002, Rached 2004, Schallin 2003, Tao 2004). Ukazuje se, že MC3R se podobně jako MC4R podílí na vzniku obezity.

3.1.2. Varianty MC4R genu (*MC4R*)

Lidské studie variant *MC4R* vycházejí z objevů provedených na KO *mc4r* myších modelech (Tab. 1) (Huszar 1997). První dvě popsané mutace *MC4R* u lidí, které kosegrovaly s obezitou, byly publikovány v roce 1998 (Vaisse 1998, Yeo 1998). Jednalo se o mutace s posunem čtecího rámce (frameshift) a vedly ke vzniku monogenní obezity s dominantní formou dědičnosti (pravděpodobně způsobené haploinsuficiencí), k urychlenému růstu a k hyperinzulinémii (Vaisse 1998, Yeo 1998).

Mutace *MC4R* byly popsány téměř u všech etnických skupin s **prevalencí mezi 0,5 – 5,8 %**. Pouze ojedinělé studie ve svých závěrech uvádějí, že mutace *MC4R* nejsou častými příčinami obezity v dané populaci (Gotoda 1997, Jacobson 2002, Ohshiro 1999). Určité mutace *MC4R* se vyskytují v řadě populací. Například Arg165Gln či Arg165Trp byly popsány jak u bílé rasy, tak i u indiánů kmene Pima (Branson 2003, Farooqi 2000, Farooqi 2003, Hinney 2003, Larsen 2005, Ma 2004, Vaisse 2000). Dalším příkladem je mutace Tyr35stop, která byla ve větším zastoupení identifikována v Dánsku, v Německu a ve Velké Británii (Farooqi 2003, Hinney 1999, Hinney 2003, Larsen 2005, Sina 1999). Nicméně chlapec z Velké Británie, nositel Tyr35stop mutace, je původem z Dánska; lze tudíž usuzovat, že vysoká prevalence Tyr35stop mutace v německé a dánské populaci je zřejmě dána přítomností společného předka (Bruun 2004, Hinney 1999, Hinney 2003, Larsen 2005, Sina 1999).

Tao se spolupracovníky rozdělil **MC4R mutace do čtyř tříd** podle vlivu na výslednou funkci MC4R (Obr. 7) (Tao 2005):

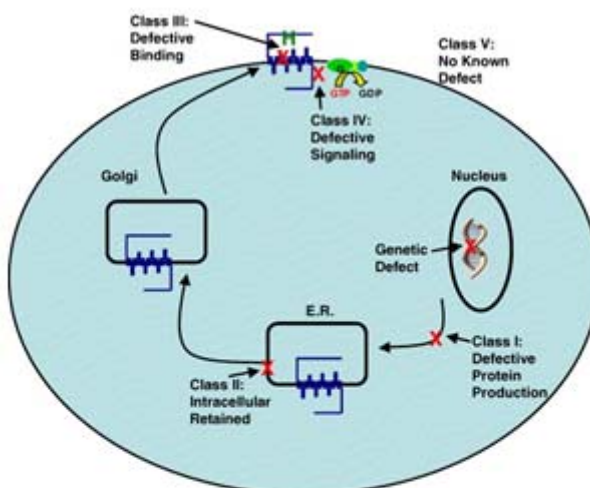
- 1. třída: chybí receptorový protein v buňce buď narušením jeho syntézy či zrychlenou degradací;
- 2. třída: zadržení receptoru uvnitř buňky nejčastěji v endoplazmatickém retikulu;
- 3. třída: narušení vazby ligandu na MC4R vlivem snížené vazebné kapacity či afinity;
- 4. třída: porucha signalizace.

2. třída zahrnuje nejvíce mutací MC4R včetně mutací s posunem čtecího rámce.

Ačkoli se předpokládá, že **haploinsuficience** je ve většině případů **MC4R** mutací zodpovědná za mnoho funkčních poruch, mohou mít mutace se stejnou funkční poruchou různou penetrací. Například mutace Tyr287stop a Asn97Asp, del188-92 a Gly98Arg vedou *in vitro* ke zcela porušené funkci receptoru. Přesto u heterozygotních nositelů těchto mutací nevzniká obezita od časného věku jako u jiných kompletně neaktivních mutací (Farooqi 2003, Kobayashi 2002, Lubrano-Berthelie 2004). Funkci (translokace do buněčné membrány, vazby agonistů a antagonistů, dimerizace, signální transdukce a interakce s G-proteinem) a důležitost jednotlivých aminokyselin či oblastí molekuly receptoru lze odvodit z analýzy funkčních poruch **MC4R** (Ho 1999, Srinivasan 2004, VanLeeuwen 2003).

Většina mutací MC4R byla nalezena v **heterozygotní formě**, i když byli identifikováni i homozygotní nositele **MC4R** mutací (Farooqi 2000, Farooqi 2003, Lubrano-Berthelie 2004, Vaisse 2000). U mutací v **homozygotní formě** se hovoří o efektu kodominance, neboť obezita u postižených osob je **závažnější a vzniká dříve** než u heterozygotů. Stejný jev byl popsán i u KO *mc4r* myších modelů (Farooqi 2003, Huszar 1997, Lubrano-Berthelie 2004).

Některé studie se zaměřily na klinické důsledky **MC4R** mutací. Kromě obezity byly zjištěny další fenotypické znaky. Farooqiová se spolupracovníky definovala tzv. **MC4R syndrom** (Tab. 3) (Bruun 2004, Farooqi 2003). Syndrom zahrnuje obdobné znaky, které byly



Obr. 7 Rozdělení genových variant MC4R

1. třída: nepřítomnost receptorového proteinu v buňce buď narušením jeho syntézy či zrychlené degradace; 2. třída: zadržení receptoru uvnitř buňky nejčastěji v endoplazmatickém retikulu; 3. třída: narušení vazby ligandu na MC4R sníženou vazebnou kapacitou či afinitou; 4. třída: porucha signalizace (Tao 2005)

nalezeny u KO *mc4r* myši (Tab. 1) (Bruun 2004, Farooqi 2003, Huszar 1997). Inaktivace *MC4R* vede k **hyperfagii** a třikrát vyššímu *ad libitum* energetickému příjmu ve srovnání se sourozenci, kteří nejsou nositeli dané mutace. Tento spontánní energetický příjem však dosahuje pouze 2/3 energetického příjmu nositelů mutace pro leptin (Farooqi 2003). Na rozdíl od osob s mutacemi genů pro LEP, LEPR a PC1 mají nositelé *MC4R* mutací normální fertilitu (Clément 1998, Farooqi 2003, Jackson 1997, Montague 1997).

Jiné studie ale ukázaly, že tzv. MC4R syndrom se neprojeví u všech nositelů mutace v *MC4R*, zejména není nápadný v dospělosti. Závěry studií dále poukazují na to, že **dospělé nositele mutace nelze odlišit od jiných obézních osob** (Hinney 1999, Hinney 2003, Larsen 2005, Vaisse 2000). Larsenová se spolupracovníky nezjistila žádný rozdíl BMI mezi obézními osobami s mutací a bez mutace (Larsen 2005). Jiná studie srovnávala věk při vzniku obezity a její závažnost mezi obézními osobami s mutací a bez *MC4R* mutace. Obézní dospělí nositelé *MC4R* mutace měli tendenci ke vzniku obezity v časnějším věku. Jejich obezita byla významně těžší pouze v období kolem 20. roku života (Vaisse 2000). Je zřejmé, že MC4R syndrom nebývá vyjádřen u dospělých nositelů mutace a závažnost fenotypu MC4R syndromu s věkem klesá (Farooqi 2000, Farooqi 2003, Larsen 2005).

V souvislosti s *MC4R* mutacemi byly také popsány epizody binge eating. Branson se spolupracovníky pozoroval toto abnormální jídelní chování u všech nositelů mutace, avšak pouze u 14 % obézních osob bez mutace a u žádného normostenika (Branson 2003). Na druhé straně, Hebebrand se spolupracovníky toto zásadně popřel, neboť u žádného nositele mutace binge eating nezjistil (Hebebrand 2004, Herpertz 2003). Studie Bransona se spolupracovníky byla podrobena kritice i z toho důvodu, že v ní byly zahrnuty různé druhy mutací a ne pouze mutace s porušenou funkcí (Farooqi 2000, Gotoda 1997, Herpertz 2003). Jelikož binge eating je spojeno s velmi nízkou úspěšností terapie obezity včetně žaludeční bandáže, bude důležité souvislost *MC4R* mutací s binge eating detailně objasnit (Kalarchian 2002).

Tab. 3 Klinické znaky u mutací v MC4R genu v dětství (tzv. MC4R syndrom)

Fenotypická charakteristika zahrnutá v tabulce vychází ze závěrů dvou studií Farooqiové se spolupracovníky (Farooqi 2000, Farooqi 2003); IGF, inzulinu podobný růstový faktor

MC4R syndrom
Časný vznik obezity - první roky života
Zvýšené růstové tempo v dětství, zejména během prvních pěti let
Normální hladiny IGF
Zvýšení tukové a netukové tkáně
Zvýšení kostní minerální denzity
Hyperfagie - mírní se s věkem
Fyziologická hodnota klidového energetického výdeje
Fyziologické hodnoty glykémie
Hyperinzulinémie - klesá s věkem
Fyziologické hladiny sérových lipidů, volného kortizolu
Fyziologické hladiny leptinu ve vztahu k věku a stupni obezity
Fyziologické hladiny tyroxinu, gonadotropinů a pohlavních steroidů
Normální fertilita a sexuální diference

V genu pro MC4R jsou známy dva polymorfismy, Val103Ile a Ile251Leu. Hinneyová se spolupracovníky vyšetřila pacienty s mentální anorexií a bulimií, avšak nenašla žádnou souvislost mezi polymorfismy genu a poruchami jídelního chování (Hinney 1999). Polymorfismus Ile103Val byl zkoumán ve dvou velkých populačních studiích. Bylo zjištěno, že nosičství Ile103 alely negativně koreluje s obezitou, kvantitativně až o 0,52 kg/m² (Geller 2004, Heid 2005). Jiná studie našla souvislost této varianty s nižším poměrem pas-boky a s tendencí k nižšímu BMI (Rosmond 2001). Funkční studie ukázaly, že tento polymorfismus nemění funkci receptoru. Vzhledem k výše uvedeným korelacím zůstává stále nejasné, zda tento polymorfismus *MC4R* nezasahuje jiným mechanismem do základní aktivity MC4R či AgRP (Haskell-Luevano 2001, Srinivasan 2004).

Studie MC4R genu dokazují, že za regulaci či interakci s MC4R je zodpovědných více kandidátních genů obezity. Mezi tyto kandidátní geny se například řadí attractin like protein a syndecan-3, které ovlivňují MC4R během vazby ligandů a následné signalizace (Haqq 2003, Reizes 2003, Strader 2004).

3.2. VÝSLEDKY STUDIE 1: Melanokortinový receptor 4. typu (MC4R)

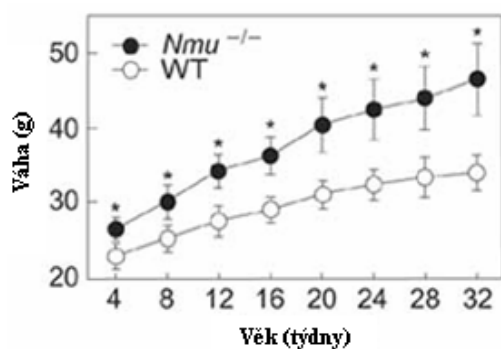
Hainerová I, Larsen LH, Holst B, Finková M, Hainer V, Lebl J, Hansen T, Pedersen O. Melanocortin 4 receptor mutations in obese Czech children: studies of prevalence, phenotype development, weight reduction response and functional analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 (v tisku).

4. STUDIE 2 - NEUROMEDIN U (NMU)

4.1. ÚVOD

Neuromedin U (NMU) je hypothalamický neuropeptid, který reguluje tělesnou hmotnost a tělesné složení. Gen kódující NMU je lokalizován na chromozomu 4q12 a obsahuje 10 exonů (Austin 1995). NMU **snižuje příjem potravy, zvyšuje energetický výdej**, navozuje stresovou odpověď a ovlivňuje cirkadiální rytmus (Hanada 2001, Wren 2002).

NMU je především produkován neurony v ARC, který hraje klíčovou roli v regulaci chuti a energetické homeostázy (Ballesta 1988, Domin 1987). Regulace energetické bilance prostřednictvím NMU není úplně jasná, avšak je prokázáno, že účinek NMU je zcela nezávislý na leptinu.



Obr. 8 Vývoj váhy myších samců – s mutací v genu pro neuromedin (Nmu^{-/-}) a bez mutace (WT)

Pokusy na myších, u kterých zcela chyběl gen kódující Nmu, ukázaly **vznik obezity s nadměrným příjmem potravy a se sníženým energetickým výdejem** (Obr. 8). Dále deficit Nmu u myších modelů vedl k hyperinzulinémii, hyperglykémii s pozdním nástupem, hyperlipidémii a hyperleptinémii (Hanada 2004). Snížený energetický výdej byl důsledkem hypoaktivity a

hypometabolismu. Došlo též ke snížené tvorbě CRH v PVN a POMC v ARC. Snížená tvorba těchto dvou anorexigenních peptidů se může podílet na hyperfagii a sníženém energetickém výdeji (Hanada 2004).

Naopak **transgenní myši** se zvýšenou expresí Nmu měly **sníženou chuť k jídlu** a byly **štíhlejší**. Zároveň byla u nich zvýšena exprese hypothalamických neuropeptidů NPY, POMC a MCH (Kowalski 2005).

Intracerebroventrikulární podání NMU myším s libovolným přísunem potravy potvrdilo, že NMU se podílí na regulaci energetické homeostázy. Při těchto pokusech došlo ke snížení energetického příjmu, ke snížení tělesné hmotnosti, zvýšení energetického výdeje, zvýšení tělesné teploty a k větší produkci tepla (Howard 2000, Nakazato 2000). Před rokem 2006 nebyly provedeny žádné studie u lidí, které by objasnily roli NMU v patogenezi obezity a regulaci energetické bilance u člověka.

4.2. VÝSLEDKY STUDIE 2: Neuromedin U (NMU)

Hainerová I, Torekov SS, Ek J, Finková M, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Madsen OD, Lebl J, Hansen T, Pedersen O. Association between Neuromedin U gene variants and overweight and obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(12): 5057-5063.

5. STUDIE 3 - GHRELIN A GROWTH HORMONE SECRETAGOGUE RECEPTOR (GHSR)

5.1. ÚVOD

5.1.1. Ghrelin

Ghrelin (ghre=růst) je peptid o 28 aminokyselinách, který byl objeven v roce 1999 při hledání ligandů GHSR (Kojima 1999). Ghrelin je syntetizován v enterochromafinních buňkách mukózy žaludku, ARC, srdci, plicích, ε-buňkách pankreatu, ve střevě a v tukové tkáni (Kojima 1999).

Ghrelin v hypofýze prostřednictvím svého receptoru **stimuluje uvolnění růstového hormonu**. Vedle toho **zvyšuje příjem potravy, snižuje odbourávání tukové tkáně, snižuje výdej energie a má další endokrinní funkce** (Tab. 4) (Korbonits 2004). Ghrelin stimuluje uvolnění inzulínu z pankreatu; k fyziologickému postprandiálnímu poklesu hladiny ghreluinu je naopak nezbytná alespoň bazální hladina inzulínu, neboť inzulín při normálních hladinách glykémie účinek ghreluinu potlačuje (Murdolo 2003). Nedávno publikovaná studie ukázala, že ghrelin se obdobně jako leptin zřejmě podílí na regulaci reprodukce (Henson 2003), avšak dosud nejasným mechanismem.

Tab. 4 Účinky ghreluinu (podle Korbonitse 2004)

Účinky ghreluinu
Uvolnění růstového hormonu ↑
Uvolnění ACTH a kortizolu ↑
Uvolnění prolaktinu ↑
Stimulace chuti k jídlu
Motilita žaludku ↑
Spánek ↑
Srdeční akce ↑
Vazodilatace ↑
Termoregulace ↓

Ghrelin se řadí mezi **orexigenní hormony**, neboť stimuluje hypothalamické neurony (Nakazato 2001) a inhibuje aferentní vlákna bloudivého nervu v žaludku (Date 2002). V regulaci energetické bilance má ghrelin přesně opačné účinky než leptin. Vyjimečný je v tom, že je jediným peptidovým hormonem, který **stimuluje chuť k jídlu po periferním podání**. U myších modelů periferní či centrální podání ghreluinu navozuje nárůst tělesné hmotnosti (Wren 2000).

U lidí hladiny ghreluinu dosahují **maxima těsně před příjmem potravy** a tím signalizují pocit hladu; postprandiálně naopak klesají (Cummings 2001, Tschop 2001). K prudkým vzestupům hladiny ghreluinu v plazmě dochází těsně před každým jídlem. Hladiny jsou trvale vysoké při dlouhodobé negativní energetické bilanci spojené s tělesnou námahou nebo s mentální anorexií (Cummings 2001, Tschop 2001).

Intravenózní podání ghrelinu stimuluje příjem potravy u lidí (Wren 2001) a dokáže zlepšit chuť k jídlu u pacientů s nádorovým onemocněním (Neary 2004).

U štíhlých jedinců po příjmu potravy hladiny ghrelinu rychle klesají na rozdíl od obézních, u kterých se hladiny ghrelinu ani po jídle nemění (English 2002). Hladiny ghrelinu nalačno jsou vyšší u štíhlých než u obézních, proto jeho hladiny negativně korelují s výší BMI. Výjimkou jsou pacienti s PWS, kteří mají hyperghrelinémii (Tschop 2001). Po redukci hmotnosti dochází k vzestupu hladin ghrelinu kromě případů, kdy redukce bylo dosažena bandáží žaludku (Cummings 2002).

5.1.2. Growth hormone secretagogue receptor (GHSR)

GHSR byl objeven v roce 1996 a řadí se k receptorům se sedmi transmembranozními úseky, které jsou spojeny s G proteinem (Howard 1996). GHSR se exprimuje v CNS zejména **v oblasti hypofýzy a hypothalamu** (Gnapavan 2002, Willeesen 1999). Gen kódující GHSR je lokalizován na chromozomu 3q26, tedy v oblasti, která je asociována se znaky obezity (Pérusse 2005). GHSR je evolučně konzervován a strukturálně je velmi podobný receptorům pro neurotensin, TRH, motilin a neuromedin (Howard 1996, Kojima 2005, Palyha 2000).

Aktivací GHSR dochází ke stimulaci NPY neuronů, které přes neurotransmiter gama-aminomáselnou kyselinu potlačují účinek POMC neuronů (Guan 2003, Hewson 2000, Kamegai 2001, Kohno 2003, McKee 1997, Nakazato 2001). Vyřazení GHSR v ARC z funkce vede k nižší tělesné hmotnosti a ke sníženému obsahu tukové tkáně (Shuto 2002).

Podáváním antagonistů GHSR se u myších modelů sníží příjem potravy (Asakawa 2003). GHSR významně zasahuje do centrálního melanokortinového systému, což lze demonstrovat na případech KO *mc4r* myši, jejichž orexigenní odpověď na podaný ghrelin je snížena. Nicméně GHSR je schopen přímou cestou komunikovat s neurony exprimujícími orexiny, MCH, CRH v LH a PVN (Cowley 2003, Mozid 2003).

5.2. VÝSLEDKY STUDIE 3: Growth hormone secretagogue receptor (GHSR)

Larsen LH, Gjesing AP, Torekov SS, **Hainerová I**, Johansen A, Albrechtsen A, Boj S, Holst B, Harper A, Urhammer SA, Hamid YH, Black E, Glümer C, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Holst JJ, Echwald SM, Eiberg H, Astrup A, Sørensen TIA, Lebl J, Schwartz TW, Hansen T, Pedersen O. Family- and population-based studies of genetic variation of the ghrelin receptor and relationships to obesity. Nabídnuto k publikaci v *J Clin Endocrinol Metab*.

6. STUDIE 4 – PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR-alpha (PPAR-alfa)

6.1. ÚVOD

PPAR-alfa patří mezi receptory transkripčních faktorů. Tento receptor ovlivňuje geny, které se podílejí na peroxisomální a mitochondriální beta-oxidaci mastných kyselin. PPAR-alfa je kódován genem *PPARA*, který je exprimován ve tkáních s nejvyšší oxidací mastných kyselin. Myši, u kterých tento receptor chybí, mají zvýšené hladiny celkového cholesterolu a HDL-cholesterolu (Gonzales 1997, Peters 1997). Z toho vyplývá, že PPAR-alfa se podílí na regulaci lipidového metabolismu. Zároveň studie na PPAR-alfa deficientních myších ukázaly, že PPAR-alfa hraje roli v regulaci tělesné hmotnosti (Costet 1998, Kim 2003).

Z funkčních studií je známo, že polymorfismus Leu163Val (rs1800206) *PPARA* vede ke zvýšení transkripční aktivity PPAR-alfa (Sapone 2000). Výsledky asociačních studií prováděných v různých populacích jsou rozporuplné. Některé studie dokládají asociaci s hladinami triacylglyceridů, celkového a LDL-cholesterolu (Nielsen 2003, Robitaille 2004, Tai 2002), jiné ji popírají (Flavell 2000, Gouni-Berthold 2004, Lacquemant 2000).

6.2. VÝSLEDKY STUDIE 4: Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR-alfa)

Sparsø T, Hussain MS, Andersen G, **Hainerová I**, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Hansen T, Pedersen O. Relationships between the functional PPAR α Leu162Val polymorphism and obesity, type 2 diabetes, dyslipidaemia, and related quantitative traits in studies of 5799 middle-aged white people. *Mol Genet Metab.* 2007; 90(2): 205-209.

7. ZÁVĚREČNÝ KOMENTÁŘ

Pandemie obezity vedla ke zvýšenému zájmu o studium její etiopatogeneze. Exponenciálně narostl počet publikací zabývajících se problematikou obezity. Díky tomu poslední desetiletí přineslo zásadně nový pohled na patogenezi obezity. Studie myších modelů velmi přispívají k identifikaci kandidátních genů obezity a mnoho studií u člověka vychází z těchto poznatků.

Obezita vzniká interakcí vnějších faktorů s faktory geneticky podmíněnými, které jsou v některých případech pro rozvoj obezity zcela klíčové. Geneticky podmíněná těžká obezita vznikající v prvních měsících či letech života je zpravidla buď důsledkem mendelovsky dědičných syndromů nebo důsledkem mutace jediného genu. Pro geneticky podmíněné syndromy spojené s obezitou je často charakteristická mentální retardace a dysmorfické vývojové vady.

Geny, jejichž mutace vedou k časně obezitě, jsou součástí komplexního systému regulace energetické rovnováhy. Jedinci s takovou mutací ve většině případů nemají kromě časně těžké obezity žádné další charakteristické znaky. Laboratorní vyšetření napomohou k diagnostice pouze několika monogenně podmíněných forem obezity, avšak i v těchto případech je třeba diagnózu potvrdit genetickou analýzou.

Mutace MC4R genu představují nejčastější příčinu monogenní obezity, neboť prevalence výskytu u osob s časně vzniklou obezitou činí v některých populacích až 5,8 %. Výskyt ostatních monogenně podmíněných forem obezity je sporadický. Přestože tyto mutace jsou velmi vzácné, lze předpokládat, že další výzkum monogenních forem obezity objasní doposud neznámé regulační cesty a molekulární komponenty ovlivňující energetickou homeostázu a snad i přispěje k vývoji terapeutických prostředků přínosných pro léčbu běžných forem obezity.

8. APPENDICES

8.1. Appendix A – Obecná metodika

Příprava 3 % gelu k elektroforéze

- 1) 4,5 g Seakem agarózy a 4,5 g NuSieve agarózy
- 2) 300ml 1xTBE pufru
- 3) nechat vařit po dobu 30s
- 4) ochladit pod tekoucí vodou
- 5) přidat 10ul Ethidium Bromid
- 6) zamíchat a nalít do elektroforetické nádoby, vložit hřebeny

Gelová elektroforéza s agarózou

- 1) do jamky v gelu 22ul vzorku DNA s 5ul pufrem (loading bufr), marker 3ul
- 2) 180V 30min. elektroforéza
- 3) UV světlo ověření fragmentu DNA

Přímá sekvenace

- 1) PCR
- 2) Exo Sap
- 3) Sekvenace
- 4) Precipitace
- 5) Vymývání
- 6) Denaturace
- 7) Sekvenátor

Ad 1) PCR: 5ul vzorku DNA + 20ul reakční směsi (PCR pufr 10x, dNTP, primery, Taq Gold DNA polymeráza, H₂O, MgCl₂)

Ad 2) Exo sap: 10ul vzorku DNA + 2ul Exo Sap, 30 min. zahřátí

Ad 3) Sekvenace:

příprava směsi na ledu: H₂O, primer (reverse či forward), pufr, BDT primer: M13R či M13F (10ul PCR primer + 990ul H₂O)
směs (20ul – množství DNA) + vzorek DNA (2 či 4 či 6ul)
PCR přístroj

Ad 4) Precipitace:

ke vzorku DNA přidat 2ul NaAc a 80ul 95% etanol (příprava na ledu)
ponechat 10 min. ve tmě na ledu
centrifuga 1hod. 3000 otáček při 4°C

Ad 5) Vymývání:

vzorek se směsí obrátit vzhůru nohama a rychle stočit (pár vteřin)
přidat 100 ul 70% etanolu ke vzorku DNA – stočit po dobu 10min.
opakovat 2 předchozí kroky
opakovat 1. krok
po vyschnutí přidat 20ul Hi-Di Formamide ke vzorku DNA

Ad 6) Denaturace:

vzorek na 2min. 95°C
ihned položit na led (nad a pod) po dobu 10min.

Ad 7) Sekvenátor: vložit do přístroje SEQ ABI 3100

8.2. Appendix B – Charakteristika vyšetřovaných skupin pacientů a kontrol

STUDIE 1: MC4R

České obézní děti a adolescenti	
Počet jedinců	289
♂ : ♀	132 : 157
Průměrný věk (roky)	4,9 ± 3,1
Průměrné Z-BMI	4,3 ± 1,7

Čeští normostenici	
Počet jedinců	53
♂ : ♀	25 : 28
Věk jedinců (roky)	5 - 44

STUDIE 2: NMU

České obézní děti a adolescenti	
Počet jedinců	289
♂ : ♀	132 : 157
Průměrný věk (roky)	4,9 ± 3,1
Průměrné Z-BMI	4,3 ± 1,7

Čeští normostenici	
Počet jedinců	53
♂ : ♀	25 : 28
Věk jedinců (roky)	5 - 44

Dánští obézní dospělí	
Počet jedinců	84
♂ : ♀	40 : 44
Průměrný věk (roky)	50 ± 15
Průměrné BMI (kg/m ²)	36 ± 5

5851 dánských osob z obecné populace	BMI < 25kg/m ²	BMI ≥ 25 kg/m ²
Počet jedinců	2586	3265
Průměrný věk jedinců (roky)	45,1 ± 7,9	46,9 ± 7,8
Průměrné BMI (kg/m ²)	22,5 ± 1,8	29,1 ± 3,8

STUDIE 3: GHSR

České obézní děti a adolescenti	
Počet jedinců	289
♂ : ♀	132 : 157
Průměrný věk (roky)	4,9 ± 3,1
Průměrné Z-BMI	4,3 ± 1,7

Dánští obézní jedinci	
Počet jedinců	82
♂ : ♀	39 : 43
Průměrné BMI (kg/m ²)	35,5 ± 4,6

Dánští štíhlí jedinci	
Počet jedinců	28
♂ : ♀	7 : 21
Průměrné BMI (kg/m ²)	20 ± 1,7

Dánská obecná populace	
Počet jedinců	6365

STUDIE 4: PPARα

Dánští dospělí	Osoby s DM2	Osoby bez DM
Počet jedinců	1383	4401
♂ : ♀	830 : 553	
Průměrný věk (roky)	59 ± 11	46 ± 8
Průměrné BMI (kg/m ²)	29,4 ± 5,1	26,3 ± 4,6

8.3. Appendix C – Protokoly jednotlivých studií

STUDIE 1 : MC4R

MC4R *gen*:

agggttaaatcaattcagggggacactggaattctctgccagc

1 **ATG** GTG AAC TCC ACC CAC CGT GGG ATG CAC ACT TCT CTG CAC CTC
 16 TGG AAC CGC AGC AGT TAC AGA CTG CAC AGC AAT GCC AGT GAG TCC
 31 CTT GGA AAA GGC TAC TCT GAT GGA GGG TGC TAC GAG CAA CTT TTT
 46 GTC TCT CCT GAG GTG TTT GTG ACT CTG GGT GTC ATC AGC TTG TTG
 61 GAG AAT ATC TTA GTG ATT GTG GCA ATA GCC AAG AAC AAG AAT CTG
 76 CAT TCA CCC ATG TAC TTT TTC ATC TGC AGC TTG GCT GTG GCT GAT
 91 ATG CTG GTG AGC GTT TCA AAT GGA TCA GAA ACC ATT ATC ATC ACC
 106 CTA TTA AAC AGT ACA GAT **ACG GAT GCA CAG AGT TTC ACA** GTG AAT
 121 ATT GAT AAT GTC ATT GAC TCG GTG ATC TGT AGC TCC TTG CTT GCA
 136 TCC ATT TGC AGC **CTG CTT TCA ATT GCA GTG GAC** AGG TAC TTT ACT
 151 ATC TTC TAT GCT CTC CAG TAC CAT AAC ATT ATG ACA GTT AAG CGG
 166 GTT GGG ATC ATC ATA AGT TGT ATC TGG GCA GCT TGC ACG GTT TCA
 181 GGC ATT TTG TTC ATC ATT TAC TCA GAT AGT AGT GCT GTC ATC ATC
 196 TGC CTC ATC ACC ATG TTC TTC ACC ATG CTG GCT CTC ATG GCT TCT
 211 CTC TAT GTC CAC ATG TTC CTG ATG GCC **AGG CTT CAC ATT AAG AGC**
 226 **ATT GCT GTC CTC CCC GGC ACT GGT GCC ATC CGC CAA GGT GCC AAT**
 241 **ATG AAG GGA** GCG ATT ACC TTG ACC ATC CTG ATT GGC GTC TTT GTT
 256 GTC TGC TGG GCC CCA TTC TTC CTC CAC TTA ATA TTC TAC ATC TCT
 271 TGT CCT CAG AAT CCA TAT TGT GTG TGC TTC ATG TCT CAC TTT AAC
 286 TTG TAT CTC ATA CTG ATC ATG TGT AAT TCA ATC ATC GAT CCT CTG
 301 ATT TAT GCA CTC CGG AGT CAA GAA CTG AGG AAA ACC TTC AAA GAG
 316 ATC ATC TGT TGC TAT CCC CTG GGA GGC CTT TGT GAC TTG TCT AGC
 331 AGA TAT **TAA**

atggggacagagcacgcaatataggaacatgcataagagacttttctactcttaccta

Primery	Sekvence primerů	velikost	T _{annealing}	[MgCl ₂]
MC4R A MC4R B	5' ATCAATTCAGGGGGACACTG 3' 3' CTG CTT TCA ATT GCA GTG GA 5'	473bp	55°C	2mM
MC4Rseq2F MC4Rseq2R	5' CG GAT GCA CAG AGT TTC ACA 3' 3' CCT TCA TAT TGG CAC CTT GG 5'	393bp	55°C	2 mM
MC4Rseq3F MC4Rseq3R	5' GG CTT CAC ATT AAG AGG ATT GC 3' 3' GAAAAGTCTCTTATGCATGT TCC 5'	388bp	55°C	2 mM

Každý z primerů byl opatřen touto nukleotidovou sekvencí:

F : 5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3'

R : 3' CAG GAA ACA GCT ATG ACC 5'

Podmínky PCR:

PCR reakční směs : Taq Gold 0,14ul, 2,5ul Buffer, 0,25ul primers, H₂O 12,86ul, dNTP 2ul, MgCl₂ 2ul

PCR reakce: 95°C/10min

40 cyklů: 95°C/30s, 55°C/30s, 72°C/1min

72°C/10min

chlazení při 4°C

STUDIE 2 : NMUNMU *gen*:

Exon 1: AGTCCTGTGTCCGGGCCCCGAGGGCACAGCCAGGGCACCAGGTGGAGCACCAGCTACGCGT
GGCGCAGCGCAGCGTCCCTAGCACCGAGCCTCCCGCAGCCGCCGAGATGCTGCGAACAGA
GAGCTGCCGCCCCAGGTGCCCCGCCGACAGGTGGCCGCGGCGTCCCCGCTCCTGCTGCT
GCTGCTGCTGCTCGCCTGGTGCGCGGGCGCCTGCCGAG

Exon 2: GTGCTCCAATATTACCTCAAGGATTACAGCCTGAACAACAGCTACAGTTGTGGAATGAG

Exon 3: ATAGATGATACTTGTTCGTCTTTTCTGTCCATTGATTCTCAGCCTCAG

Exon 4: GCATCCAACGCACTGGAGGAGCTTTGCTTTATGATTATGGGAATGCTACCAAAGCCTCAG

Exon 5: GAACAAGATGAAAAAGATAATACTAAAAGG

Exon 6: TTCTTATTTTCATTATTCGAAGACACAGAAGTTGGGCAAGTCAAATGTTGTG

Exon 7: CGTTCAGTTGTGCATCCGTTGCTGCAGCTCGTTCCTCACCTGCATGAGAGAAGAATGAAG
AGATTACAGAGTGGAC

Exon 8: GAAGAATTCCAAAGTCCCTTTGCAAGTCAAAGTCGAGGATATTTTTTATTTCAGG

Exon 9: CCACGGAATGGAAGAAGTTCAGCAGGGTTCATTTAAAATG

Exon 10: GATGCCAGCTAATTTTTCCACAGAGCAATGCTATGGAATACAAAATGTACTGACATTTTGT
TTTTCTCTGAAAAAATCCTTGCTAAATGTACTCTGTTGAAAAATCCCTGTGTTGTCAATG
TTCTCAGTTGTAACAATGTTGTAATGTTCAATTTGTTGAAAATT

pozn. kódující část peptidu leží mezi podtrženými úseky

Primery:

NMU1F: TTATCCCAGAGCGAAAATGC
NMU1R: ACTTGGCTTCTGGGACTTCA
NMU2F: TCCTTGACTAAGTCAAATGCTGAA
NMU2R: TTTTGTCTTCTCTCCTTCTCTTT
NMU3F: TGAGGGAAGTCTCATTTCCAA
NMU3R: AACACAAGCCCACAGTATTGA
NMU4F: TCCTCATGCCCTAACATTT
NMU4R: TGGCATGCTTCTAAATTGG
NMU56F: TCCATTTATTTTTAGAGCAACG
NMU56R: TTGAATTTCAATCCTTTACTCACA
NMU7F: TTGTCTGGGACAAGTTTAGTGG
NMU7R: TCCTGAAGAGCAGCATTTGA
NMU9F: CAAATTTCTCAGGATTCTCAGACTTAC
NMU9R: CATTTCATGTACATATGCAATCAAATAA
NMU10F: GGGAAATATGTCAGATGCTACTGTT
NMU10R: TGTGCTGTACTGTCAAACCTG

Podmínky PCR:

PCR reakce: 95°C/10min
počet cyklů: 95°C/30s, T_{annealing}/30s, 72°C/1min
72°C/10min
chlazení při 4°C

Primery	T _{annealing}	[MgCl ₂]	DMSO	Počet cyklů
Ex 1	57°C	1mM	5% konečného objemu	40
Ex 2	60°C	3mM	-	40
Ex 3	57°C	2mM	-	40
Ex 4	55°C	3mM	-	40
Ex 56	55°C	3 mM	-	40
Ex 7	55°C	3 mM	-	40
Ex 8	57°C	3 mM	-	35
Ex 9	55°C	3 mM	-	40
Ex 10	57°C	2 mM	-	40

dHPLC podmínky:

Exon	Teplota (°C)/objem (ul)	Teplota (°C)/objem (ul)	Teplota (°C)/objem (ul)
1	64,2 / 9	67,4 / 8	-
2	54,2 / 8	55,5 + 0,8 TS / 8	-
3	55,9 / 8	-	-
4	56,2 / 10	57,6 + 0,5 TS / 10	-
56	51,4 / 10	52,3 + 0,5 TS / 10	53,8 + 1,0 TS / 10
7	60,1 + 0,3 TS / 10	61,1 / 10	-
8	53,1/8	54,4/ 8	-
9	52,5 / 8	54,9 + 0,5 TS / 8	-
10	53,2 / 10	54,7 + 0,5 TS / 10	-

STUDIE 3: GHSR

GHSR *gen* - *sekvenovaná oblast (promotor)*:

ATGGAACTGGATCGAGAACGCAAATGCGAGGCAGGGCTGGTGACAGGTAT
 GCGTGTGGGCGCCGGCCGGAGGATGTGTTGGGAGAACTTTGGGGGAGTT
 GGTGGGGGAAAGGGGAGGTGTCAGAGAAAGCAGTGGGTCACTCTCTCACC
 CACTGACCACCAGCCTCTCTCCCTCTTCTTGTCCCCATCTCACCTTCTTCCCT
 CGGCTTCTGCCTCTCACCTC(C/T)CTCTCTTCTTCTCCAAGCATCCTCC

Primer GHS-R pro 1F: 5'ATG GAA CTG GAT CGA GAA CG `3

Primer GHS-R pro 1R: 5'GGA GGA TGC TTG GAG AAG AA `3

Oba primery byly opatřeny touto nukleotidovou sekvencí - F: 5'TGT AAA ACG ACG GCC 3'
 R: 5'CAG CAA ACA GCT ATG 3'

PCR podmínky:

PCR reakční směs: 10xBuffer 2,5ul; H₂O 7,87ul; MgCl₂ 2ul; dNTP 2ul; primers 0,25ul; Taq Gold 0,13ul

PCR reakce: 95°C/10min

40 cyklů: 95°C/30s, 60°C/30s, 72°C/30s

72°C/10min

chlazení při 4°C

STUDIE 4: PPAR α

Genetická analýza polymorfismu Leu162Val byla provedena mimo výzkumnou laboratoř vzhledem k početnosti skupiny.

8.4. Appendix D - Užitečné webové stránky

Genom eukaryontů: <http://www.ensembl.org>; www.ncbi.nlm.nih.gov

Výběr primerů: <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi>

Predikce konzervace mezi druhy a struktura proteinu:

<http://www.cmpfarm.ucsf.edu/~nomi/nnpredict.html>

<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-search/protein-search.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Nomeklatura mutací: <http://www.genomic.unimelb.edu.au/mdi/mutnomen/recs.html>

Přehled odborných článků: www.pubmed.com

Genová mapa lidské obezity: <http://obesitygene.pbrc.edu>

9. SOUHRN V ANGLICKÉM JAZYCE – ENGLISH SUMMARY

Within the last decade an intensive research led to identification of several genes that are involved in regulation of energy balance. In most cases, carriers of these gene mutations do not exhibit further characteristic phenotypic features except for severe obesity. Obesity resulting from mutations of one gene product is called monogenic obesity. Mutations in genes for leptin, leptin receptor, proopiomelanocortin, prohormone convertase 1, melanocortin receptor type 4 and melanocortin receptor type 3 disrupt the physiological humoral feedback between peripheral signals and the hypothalamic centers of satiety and hunger. Defects of any of the above mentioned genes lead to phenotype of abnormal eating behavior followed by development of severe and early-onset obesity. Mutations of melanocortin receptor type 4 gene represent the most common cause of monogenic obesity, being detected in almost 6 % of children with early-onset severe obesity. Mutations of the additional genes involved in energy homeostasis are very rare.

Although these mutations are sporadic we assume that further research of monogenic forms of obesity is going to extend our understanding of physiology and pathophysiology of regulation of energy homeostasis and eating behavior. Additionally, new approach to the management of eating behavior and to the treatment of obesity may result from these studies.

The aim of this PhD research was to reveal the ethiopathogenesis of early-onset obesity in Czech children.

- *Introduction:* Mutations in genes involved in the regulation of energy homeostasis result in early-onset obesity.
- *Aims:*
 1. to estimate the prevalence of melanocortin receptor type 4 (MC4R) gene mutations, to evaluate phenotypic features of the mutation carriers, to determine the effect of weight management among MC4R mutation carriers and to perform functional analysis of a novel variant;
 2. to perform first mutation analysis of neuromedin U (NMU) gene;
 3. to genotype one rare variant of the growth hormone secretagogue receptor (GHSR) gene;
 4. to genotype polymorphism Leu162Val of the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR α) gene.

- Patients and methods: We analyzed the coding regions of *MC4R* and *NMU* in a cohort of 289 Czech children and adolescents with early-onset obesity by direct sequencing. Data on weight, height, BMI, biochemical parameters and a weight loss follow-up study were obtained. *In vitro* functional analysis of one novel variant of *MC4R* was performed. Further, we performed genotyping of one variant in the *GHSR* promoter area in the children cohort. The genotype-phenotype association of one rare variant of *GHSR* and one polymorphism of *NMU* and *PPARA* was done in the Danish adult population.
- Results:
 1. We identified six different mutations in *MC4R* in seven probands including one novel missense mutation Cys84Arg. A retrospective comparison of weight, height and BMI of mutation carriers and non-carriers within a 13-year follow-up period did not reveal any significant differences. *MC4R* mutation carriers exhibited a similar ability to lose weight as obese non-carriers. The novel variant Cys84Arg showed a significant reduction in cAMP signal properties of the *MC4R*.
 2. We detected one rare *NMU* Arg165Trp variant that co-segregated with childhood obesity in a Czech family. The *NMU* polymorphism (Ala19Glu) associated with overweight and obesity in Danish adult population.
 3. We identified two unrelated subjects who carry a rare variant (-151C/T) in the promoter region of the *GHSR*. This variant co-segregated with obesity in one of the family. Genotyping in 6365 Danish subjects showed that this variant is not associated with obesity. The rare but functional -151C/T variant of *GHSR* may in some families increase risk of obesity whereas common variation in *GHSR* did not increase risk of obesity in the examined population of middle-aged whites.
 4. The polymorphism Leu162Val of *PPARA* associates neither with diabetes nor obesity. Homozygous carriers of this variant have an increased levels of serum lipids.
- Conclusions: We found a prevalence of 2.4 % of *MC4R* mutations in obese Czech children. Further, our finding suggests that *NMU* is involved in energy regulation in humans. Variants of *GHSR* do not associate with obesity; Leu162Val polymorphism of *PPARA* is associated with dyslipidemia.

Three papers have already been published in peer-reviewed journals, one additional paper is currently under revision. Further on, review articles concerning genetic forms of obesity have been published in Czech medical journals and are included in this PhD thesis. In conclusion, results of the performed studies substantially contributed to understanding of the pathophysiology of obesity development.

10. LITERATURA

1. **Abdel-Malek ZA.** Melanocortin receptors: their functions and regulation by physiological agonists and antagonists. *Cell Mol Life Sci.* 2001; 58(3): 434-441.
2. **Allison KC,** Stunkard AJ, Their SL. Overcoming night eating syndrome. A step-by-step to breaking the cycle. Oakland, CA: New Harbinger Publications. 2004.
3. **Angelopoulos N,** Goula A, Tolis G. Current knowledge in the neurophysiologic modulation of obesity. *Metabolism.* 2005; 54(9): 1202-1217.
4. **Aoyama T,** Peters JM, Iritani N, Nakajima T, Furihata K, Hashimoto T, Gonzales FJ. Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α). *J Biol Chem.* 1998; 273(10): 5678-5684.
5. **Argyropoulos G,** Rankinen T, Neufeld DR, Rice T, Province MA, Leon AS, Skinner JS, Wilmore JH, Rao DC, Bouchard C. A polymorphism in the human agouti-related protein is associated with late-onset obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87(9): 4198-4202.
6. **Asakawa A,** Inui A, Kaga T, Katsuura G, Fujimiya M, Fujino MA, Kasuga M. Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. *Gut.* 2003; 52(7): 947-952.
7. **Auboeuf D,** Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M, Vidal H. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes.* 1997; 46(8): 1319-1327.
8. **Austin C,** Lo G, Nandha KA, Meleagros L, Bloom SR. Cloning and characterization of the cDNA encoding the human neuromedin U (NmU) precursor: NmU expression in the human gastrointestinal tract. *J Mol Endocrinol.* 1995; 14(2): 157-169.
9. **Baecke JAH,** Burema J, Frihters JER. A short questionnaire for the measurement of habitual physical activity in epidemiological studies. *Am J Clin Nutr.* 1982; 36(5): 936-942.
10. **Baessler A,** Hasinoff MJ, Fischer M, Reinhard W, Sonnenberg GE, Olivier M, Erdmann J, Schunkert H, Doering A, Jacob HJ, Comuzzie AG, Kissebah AH, Kwitek AE. Genetic linkage and association of the growth hormone secretagogue receptor (ghrelin receptor) gene in human obesity. *Diabetes.* 2005; 54(1): 259-267.
11. **Bai F,** Rankinen T, Charbonneau C, Belsham DD, Rao DC, Bouchard C, Argyropoulos G. Functional dimorphism of two hAgRP promoter SNPs in linkage disequilibrium. *J Med Genet.* 2004; 41(5): 350-353.
12. **Ballesta J,** Carlei F, Bishop AE, Steel JH, Gibson SJ, Fahey M, Hennessey R, Domin J, Bloom SR, Polak JM. Occurrence and development pattern of neuromedin U-immunoreactive nerves in the gastrointestinal tract and brain of the rat. *Neuroscience.* 1988; 25(3): 797-816.
13. **Bell CG,** Walley AJ, Froguel P. The genetics of human obesity. *Nat Rev Genet.* 2005; 6(3): 221-234.
14. **Benjannet S,** Rondeau N, Day R, Chretien M, Seidah NG. PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88(9): 3564-3568.
15. **Bhattacharyya S,** Luan J, Farooqi IS, Keogh J, Montague C, Brennand J, Jorde L, Wareham NJ, O'Rahilly S. Studies of the neuromedin U-2 receptor gene in human obesity: evidence for the existence of two ancestral forms of the receptor. *J Endocrinol.* 2004; 183(1): 115-120.
16. **Bossé Y,** Després JP, Bouchard C, Pérusse L, Vohl MC. The peroxisome proliferator-activated receptor α L162V mutation is associated with reduced adiposity. *Obes Res.* 2003; 11(7): 809-816.
17. **Boucher N,** Lanouette CM, Larose M, Pérusse L, Bouchard C, Chagnon YC. A +2138InsCAGACC polymorphism of the melanocortin receptor 3 gene is associated in human with fat level and partitioning in interaction with body corpulence. *Mol Med.* 2002; 8(3): 158-165.
18. **Braissant O,** Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- α , - β , - γ in the adult rat. *Endocrinology.* 1996; 137(1): 354-366.
19. **Branson R,** Potoczna N, Kral JG, Lentos KU, Hoehle MR, Horber FF. Binge eating as a major phenotype of melanocortin 4 receptor gene mutations. *N Engl J Med.* 2003; 348(12): 1096-1103.
20. **Bruun JM,** Pedersen SB, Richelsen B. Monogenic obesity with special focus on

- the melanocortin 4 receptor gene mutations. *Ugeskr Laeger*. 2004; 166(43): 3811-3814.
21. **Buetow KH**, Edmonson M, MacDonald R, Clifford R, Yip P, Kelley J, Little DP, Strausberg R, Koester H, Cantor CR, Braun A. High-throughput development and characterization of a genomewide collection of gene-based single nucleotide polymorphism markers by chip-based matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(2): 581-584.
 22. **Buono P**, Pasanisi F, Nardelli C, Ieno L, Capone S, Liguori R, Finelli C, Oriani G, Contaldo F, Sacchetti L. Six novel mutations in the proopiomelanocortin and melanocortin receptor 4 genes in severely obese adults living in southern Italy. *Clin Chem*. 2005; 51(8): 1358-1364.
 23. **Butler AA**, Marks DL, Fan W, Kuhn CM, Bartolome M, Cone RD. Melanocortin-4 receptor is required for acute homeostatic responses to increased dietary fat. *Nat Neurosci*. 2001; 4(6): 605-611.
 24. **Butler AA**, Cone RD. Knockout studies defining roles for melanocortin receptors in energy homeostasis. *Am N Y Acad Sci*. 2003; 994: 240-245.
 25. **Castro MG**, Morisson E. Post-translational processing of proopiomelanocortin in the pituitary and in the brain. *Crit Rev Neurobiol*. 1997; 11(1): 35-37.
 26. **Clément K**, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gormelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougneres P, Lebouc Y, Froguel P, Guy-Grand B. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*. 1998; 392(6674): 398-401.
 27. **Coleman DL**. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia*. 1978; 14(3): 141-148.
 28. **Coleman DL**, Eicher EM. Fat (fat) and tubby (tubby): two autosomal recessive mutations causing obesity syndromes in the mouse. *J Hered*. 1990; 81(6): 424-427.
 29. **Cool DR**, Normant E, Shen F, Chen HC, Pannell L, Zhang Y, Loh YP. Carboxypeptidase E is a regulated secretory pathway sorting receptor: genetic obliteration leads to endocrine disorders in Cpe (fat) mice. *Cell*. 1997; 88(1): 73-83.
 30. **Cool DR**, Loh YP. Carboxypeptidase E is a sorting receptor for prohormones: binding and kinetic studies. *Mol Cell Endocrinol*. 1998; 139(1-2): 7-13.
 31. **Cossrow N**, Falkner B. Race/ethnic issues in obesity and obesity-related comorbidities. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89(6): 2590-2594.
 32. **Costet P**, Legendre C, More J, Edgar A, Galtier P, Pineau T. Peroxisome proliferator-activated receptor α -isoform deficiency leads to progressive dyslipidemia with sexually dimorphic obesity and steatosis. *J Biol Chem*. 1998; 273(45): 29577-29585.
 33. **Costill DL**. Carbohydrates for exercise: dietary demands for optimal performance. *Int J Sports Med*. 1988; 9(1): 1-18.
 34. **Cowley MA**, Pronchuk N, Fan W, Dinulescu DM, Colmers WF, Cone RD. Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron*. 1999; 24(1): 155-163.
 35. **Cowley MA**, Smith RG, Diano S, Tschop M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nillni EA, Mendez P, Low MJ, Sotonyi P, Friedman JM, Liu H, Pinto S, Colmers WF, Cone RD, Horvath TL. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*. 2003; 37(4): 649-661.
 36. **Cummings DE**, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A prandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*. 2001; 50(8): 1714-1719.
 37. **Cummings DE**, Schwartz MW. Genetics and pathophysiology of human obesity. *Annu Rev Med*. 2003; 54: 453-471.
 38. **Cummings DE**, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP, Purnell JQ. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med*. 2002; 346(21): 1623-1630.
 39. **Date Y**, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Nijijima A, Matsuo H, Kangawa K, Nakazato M. The role of gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology*. 2002; 123(4): 1120-1128.
 40. **Dempfle A**, Hinney A, Heinzel-Gutenbrunner M, Raab M, Geller F, Gudermann T, Schäfer H, Hebebrand J. Large quantitative effect of melanocortin-4 receptor gene mutations on body mass

- index. *J Med Genet.* 2004; 41(10): 795-800.
41. **Deng HW**, Deng H, Liu YJ, Xu FH, Shen H, Conway T, Li JL, Huang QY, Davies KM, Recker RR. A genomewide linkage scan for quantitative-trait loci for obesity phenotypes. *Am J Hum Genet.* 2002; 70(5): 1138-1151.
 42. **Detera-Wadleigh SD**, Fanning TG. Phylogeny of the steroid receptor superfamily. *Mol Phylogenet Evol.* 1994; 3(3): 192-205.
 43. **Devlin MJ**, Goldfein JA, Dobrow I. What is this thing called BED? Current status on binge eating nosology. *Int J Eat Disord.* 2003; 34(Suppl 1): 2-18.
 44. **Djouadi F**, Weinheimer CJ, Saffitz JE, Pitchford C, Bastin J, Gonzales FJ, Kelly DP. A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator-activated receptor α -deficient mice. *J Clin Invest.* 1998; 102(6): 1083-1091.
 45. **Domin J**, Ghatei MA, Chohan P, Bloom SR. Neuromedin U: a study of its distribution in the rat. *Peptides.* 1987; 8(5): 779-784.
 46. **Doney ASF**, Fischer B, Lee SP, Morris AD, Leese G, Palmer CN. Association of common variation in the PPARA gene with incident myocardial infarction in individuals with type 2 diabetes. A Go-DARTS study. *Nucl Recept.* 2005; 3: 4.
 47. **Dubern B**, Clément K, Pelloux V, Froguel P, Girardet JP, Guy-Grand B, Tounian P. Mutational analysis of melanocortin-4 receptor, agouti-related protein and alpha-melanocyte-stimulating hormone genes in severely obese children. *J Pediatr.* 2001; 139(2): 204-209.
 48. **Echwald SM**, Sorensen TI, Andersen T, Tybjaerg-Hansen A, Clausen JO, Pedersen O. Mutational analysis of the proopiomelanocortin gene in Caucasians with early onset obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1999; 23(3): 289-293.
 49. **English PJ**, Ghatei MA, Malik IA, Bloom SR, Wilding JP. Food fails to suppress ghrelin levels in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87(6): 2984.
 50. **Evans D**, Aberle J, Wendt D, Wolf A, Beisiegel U, Mann WA. A polymorphism L162V, in the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) gene is associated with lower body mass index in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Mol Med.* 2001; 79(4): 198-204.
 51. **Farooqi IS**, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham, CH, Prentice, AM, Hughes, IA., McCamish, MA, O'Rahilly S. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med.* 1999; 341(12): 879-884.
 52. **Farooqi IS**, Yeo GS, Keogh JM, Aminian S, Jebb SA, Butler G, Cheetham T, O'Rahilly S. Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J Clin Invest.* 2000; 106(2): 271-279.
 53. **Farooqi IS**, Yeo GS, O'Rahilly S. Binge eating as a phenotype of melanocortin 4 receptor gene mutations. *N Engl J Med.* 2003; 349(6): 606-609.
 54. **Farooqi IS**, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, Sanna V, Jebb SA, Perna F, Fontana S, Lechler RI, DePaoli AM, O'Rahilly S. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest.* 2002; 110(8): 1093-1103.
 55. **Farooqi IS**, Keogh JM, Yeo GS, Lank EJ, Cheetham T, O'Rahilly S. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor. *N Eng J Med.* 2003; 348(12): 1085-1095.
 56. **Fisher SL**, Yagaloff KA, Burn P. Melanocortin and leptin signaling systems: central regulation of catabolic energy balance. *J Recept Signal Transduct Res.* 1999; 19(1-4): 203-216.
 57. **Flavell DM**, Torra IP, Jamshidi Y, Evans D, Diamond JR, Elkeles RS, Bujac SR, Miller G, Talmud PJ, Staels B, Humphries SE. Variation in the PPAR α gene is associated with altered function in vitro and plasma lipid concentrations in type II diabetic subjects. *Diabetologia.* 2000; 43(5): 673-680.
 58. **Flint A**, Raben A, Blundell JE, Astrup A. Reproducibility, validity and power of visual analogue scales in assessment of subjective appetite sensations in single meal test studies. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000; 24(1): 38-48.
 59. **Fong TM**, Mao C, MacNeil T, Kalyani R, Smith T, Weinberg D, Tota MR, Van der Ploeg LH. ART (protein product of agouti-related transcript) as an antagonist of MC-3 and MC-4 receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 237(3): 629-631.
 60. **Gale SM**, Castracane VD, Mantzoros CS. Energy homeostasis, obesity and eating disorders: recent advances in endocrinology. *J Nutr.* 2004; 134(2): 295-298.

61. **Gantz I**, Konda Y, Tashiro T, Shimoto Y, Miwa H, Munzert G, Watson SJ, DelValle J, Yamada T. Molecular cloning of a novel melanocortin receptor. *J Biol Chem.* 1993a; 268(11): 8246-8250.
62. **Gantz I**, Miwa H, Konda Y, Shimoto Y, Tashiro T, Watson SJ, DelValle J, Yamada T. Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *J Biol Chem.* 1993b; 268(20): 15174-15179.
63. **Geller F**, Reichwald K, Dempfle A, Illig T, Vollmert C, Herpertz S, Siffert W, Platzer M, Hess C, Gudermann T, Biebermann H, Wichmann HE, Schafer H, Hinney A, Hebebrand J. Melanocortin-4 receptor gene variant I103 is negatively associated with obesity. *Am J Hum Genet.* 2004; 74(3): 572-581.
64. **Gibson WT**, Farooqi IS, Moreau M, DePaoli AM, Lawrence E, O'Rahilly S, Trussell RA. Congenital leptin deficiency due to homozygosity for the Delta133G mutation: report of another case and evaluation of response to four years of leptin therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(10): 4821-4826.
65. **Gnanapavan S**, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87(6): 2988-2991.
66. **Gonzales FJ**. Recent update on the PPAR α -null mouse. *Biochimie.* 1997; 79(2-3): 139-144.
67. **Gotoda T**. Binge eating as a phenotype of melanocortin 4 receptor gene mutations. *N Engl J Med.* 2003; 349(6): 606-609.
68. **Gotoda T**, Scott J, Aitman TJ. Molecular screening of the human melanocortin-4 receptor gene: identification of a missense variant showing no association with obesity, plasma glucose, or insulin. *Diabetologia.* 1997; 40(8): 976-979.
69. **Gouni-Berthold I**, Giannakidou E, Müller-Wieland D, Faust M, Kotzka J, Berthold HK, Krone W. Association between the PPAR α L162V polymorphism, plasma lipoprotein levels, and atherosclerotic disease in patients with diabetes mellitus type 2 and in nondiabetic controls. *Am Heart J.* 2004; 147(6): 1117-1124.
70. **Graham M**, Shutter JR, Sarmiento U, Sarosi I, Stark KL. Overexpression of Agrt leads to obesity in transgenic mice. *Nat Genet.* 1997; 17(3): 273-274.
71. **Gu W**, Tu Z, Kleyn PW, Kissebah A, Dubrat L, Lee J, Chin W, Maruti S, Deng N, Fisher SL, Franco LS, Burn P, Yagaloff KA, Nathan J, Heymsfield S, Albu J, Pi-Sunyer FX, Allison DB. Identification and functional analysis of novel human melanocortin-4 receptor variants. *Diabetes.* 1999; 48(3): 635-639.
72. **Guan JL**, Wang QP, Kageyama H, Takenoya F, Kita T, Matsuoka T, Funahashi H, Shioda S. Synaptic interactions between ghrelin- and neuropeptide Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Peptides.* 2003; 24(12): 1921-1928.
73. **Hainerová I**, Lebl J, Hainer V, Finková M, Larsen LL, Hansen T, Pedersen O. Mutation in melanocortin 4 receptor (MC4R) in Czech obese children: prevalence, phenotype and weight reduction of the carriers. *Obes Rev.* 2006; 7(Suppl.2): 163.
74. **Hanada R**, Nakazato M, Murakami N, Sakihara S, Yoshimatsu H, Toshinai K, Hanada T, Suda T, Kangawa K, Matsukura S, Sakata T. A role for neuromedin U in stress response. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 289(1): 225-228.
75. **Hanada R**, Teranishi H, Pearson JT, Kurokawa M, Hosoda H, Fukushima N, Fukue Y, Serino R, Fujihara H, Ueta Y, Ikawa M, Okabe M, Murakami N, Shirai M, Yoshimatsu H, Kangawa K, Kojima M. Neuromedin U has a novel anorexigenic effect independent of the leptin signaling pathway. *Nat Med.* 2004; 10(10): 1067-1073.
76. **Halaas JL**, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science.* 1995; 269(5223): 543-546.
77. **Haqq AM**, Rene P, Kishi T, Khong K, Lee CE, Liu H, Friedman JM, Elmquist JK, Cone RD. Characterization of a novel binding partner of the melanocortin-4 receptor: attractin-like protein. *Biochem J.* 2003; 376(3): 595-605.
78. **Harris M**, Aschkenasi C, Elias CF, Chandrankunnel A, Nillni EA, Bjorbaek C, Elmquist JK, Flier JS, Hollenberg AN. Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *J Clin Invest.* 2001; 107(1): 111-120.
79. **Haskell-Luevano C**, Monck EK. Agouti-related protein functions as an inverse agonist at a constitutively active brain

- melanocortin-4 receptor. Regul Pept. 2001; 99(1): 1-7.
80. **Hebebrand J**, Geller F, Dempfle A, Heinzl-Gutenbrunner M, Raab M, Gerber G, Wermter AK, Horro FF, Blundell J, Schafer H, Remschmidt H, Herpertz S, Hinney A. Binge-eating episodes are not characteristic of carriers of melanocortin-4 receptor gene mutations. Mol Psychiatry. 2004; 9(8): 796-800.
81. **Heid IM**, Vollmert C, Hinney A, Doring A, Geller F, Lowel H, Wichmann HE, Illig T, Hebebrand J, Kronenberg F, KORA Group. Association of the 1031 MC4R allele with decreased body mass in 7937 participants of two population based surveys. J Med Genet. 2005; 42(4): e21.
82. **Henson MC**, Castrane VD, eds. Leptin and reproduction. 2003. Kluwer Academic Publishers, New York, NY.
83. **Heo M**, Leibel RL, Boyer BB, Chung WK, Koulu M, Karvonen MK, Pesonen U, Rissanen A, Laakso M, Uusitupa MI, Chagnon Y, Bouchard C, Donohoue PA, Burns TL, Shuldiner AR, Silver K, Andersen RE, Pedersen O, Echwald S, Sorensen TI, Behn P, Permutt MA, Jacobs KB, Elston RC, Hoffman DJ, Allison DB. Pooling analysis of genetic data: the association of leptin receptor (LEPR) polymorphisms with variables related to human adiposity. Genetics. 2001; 159(3): 1163-1178.
84. **Herpertz S**, Siffert W, Hebebrand J. Binge eating as a phenotype of melanocortin 4 receptor gene mutations. N Engl J Med. 2003; 349(6): 606-609.
85. **Hewson AK**, Dickson SL. Systematic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. J Neuroendocrinol. 2000; 12(11): 1047-1049.
86. **Hinney A**, Becker I, Heibult O, Nottebom K, Schmidt A, Ziegler A, Mayer H, Siegfried W, Blum WF, Remschmidt H, Hebebrand J. Systematic mutation screening of the pro-opiomelanocortin gene: identification of several genetic variants including three different insertions, one nonsense and two missense point mutations in probands of different weight extremes. J Clin Endocrinol Metab. 1998; 83(10): 3737-3741.
87. **Hinney A**, Bettecken T, Tarnow P, Brumm H, Reichwald K, Lichtner P, Scherag A, Nguyen TT, Schlumberger P, Rief W, Vollmert C, Illig T, Wichmann H-E, Schäfer H, Platzer M, Biebermann H, Meitinger T, Hebebrand J. Prevalence, spectrum and functional characterization of melanocortin-4 receptor gene mutations in a representative population-based sample and obese adults from Germany. J Clin Endocrinol Metab. 2006; 91(5): 1761-1769.
88. **Hinney A**, Schmidt A, Nottebom K, Heibult O, Becker I, Ziegler A, Gerber G, Sina M, Gorg T, Mayer H, Siegfried W, Fichter M, Remschmidt H, Hebebrand J. Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. J Clin Endocrinol Metab. 1999; 84(4): 1483-1486.
89. **Hinney A**, Hohmann S, Geller F, Vogel C, Hess C, Wermter AK, Brokamp B, Goldschmidt H, Siegfried W, Remschmidt H, Schafer H, Gudermann T, Hebebrand J. Melanocortin-4 receptor gene: case-control study and transmission disequilibrium test confirm that functionally relevant mutations are compatible with a major gene effect for extreme obesity. J Clin Endocrinol Metab. 2003; 88(9): 4258-4267.
90. **Ho G**, MacKenzie RG. Functional characterization of mutations in melanocortin-4 receptor associated with human obesity. J Biol Chem. 1999; 274(50): 35816-35822.
91. **Ho SN**, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. Gene. 1998; 77(1): 51-59.
92. **Holder JL Jr**, Butte NF, Zinn AR. Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene. Hum Mol Genet. 2000; 9(1): 101-108.
93. **Holst B**, Cygankiewicz A, Jensen TH, Ankersen M, Schwartz TW. High constitutive signaling of the ghrelin receptor – identification of a potent inverse agonist. Mol Endocrinol. 2003; 17(11): 2201-2210.
94. **Holst B**, Schwartz TW. Constitutive ghrelin receptor activity as a signaling set-point in appetite regulation. Trends Pharmacol. 2004; 25(3): 113-117.
95. **Holst B**, Schwartz TW. Ghrelin receptor mutations – too little height and too much hunger. J Clin Invest. 2006; 116(3): 637-641.
96. **Howard AD**, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha PC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chung

- LY, Elbrecht A, Dashkevicz M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, Van der Ploeg LH. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*. 1996; 273(5277): 974-977.
97. **Howard AD**, Wang R, Pong SS, Mellin TN, Strack A, Guan XM, Zeng Z, Williams DL, Feighner SD, Nunes CN, Murphy B, Stair JN, Yu H, Jiang Q, Clements MK, Tan CP, McKee KK, Hreniuk DL, McDonalds TP, Lynch KR, Evans JF, Austin CP, Caskey CT, Van der Ploeg LHT, Liu Q. Identification of receptors for neuromedin U and its role in feeding. *Nature*. 2000; 406(6791): 70-74.
98. **Huszar D**, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Barkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*. 1997; 88(1): 131-141.
99. **Challis BG**, Pritchard LE, Creemers JW, Delplanque J, Keogh JM, Luan J, Wareham NJ, Yeo GS, Bhattacharyya S, Froguel P, White A, Farooqi IS, O'Rahilly S. A missense mutation disrupting a dibasic prohormone processing site in pro-opiomelanocortin (POMC) increases susceptibility to early-onset obesity through a novel mechanism. *Hum Mol Genet*. 2002; 11(17): 1997-2004.
100. **Chhajlani V**, Wikberg JE. Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA. *FEBS Lett*. 1992; 309(3): 417-420.
101. **Chen AS**, Marsh DJ, Trumbauer ME, Frazier EG, Guan XM, Yu H, Rosenblum CI, Vongs A, Feng Y, Ca L, Metzger JM, Strack AM, Camacho RE, Mellin TN, Nunes CN, Min W, Fisher J, Gopal-Truter S, MacIntyre DE, Chen HY, Van der Ploeg LH. Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat Genet*. 2000a; 26(1): 97-102.
102. **Chen AS**, Metzger JM, Trumbauer ME, Guan XM, Yu H, Frazier EG, Marsh DJ, Forrest MJ, Gopal-Truter S, Fisher J, Camacho RE, Strack AM, Mellin TN, MacIntyre DE, Chen HY, Van der Ploeg LH. Role of the melanocortin-4 receptor in metabolic rate and food intake in mice. *Transgenic Res*. 2000b; 9(2): 145-154.
103. **Chen D**, Garg A. Monogenic disorders of obesity and body fat distribution. *J Lipid Res*. 1999; 40(10): 1735-1746.
104. **Chen H**, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstern JP. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*. 1996; 84(3): 491-495.
105. **Chua SC Jr**, Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu SM, Tartaglia L, Leibel RL. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science*. 1996; 271(5251): 994-996.
106. **Jackson RS**, Creemers JWM, Ohagi S, Raffin-Sanson ML, Sanders L, Montague CT, Hurton JC, O'Rahilly S. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet*. 1997; 16(3): 303-306.
107. **Jacobson P**, Ukkola O, Rankinen T, Snyder EE, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Wilmore JH, Lonn L, Cowan GS Jr, Sjostrom L, Bouchard C. Melanocortin 4 receptor sequence variations are seldom a cause of human obesity: the Swedish obese subjects, the Heritage family study, and a Memphis cohort. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87(10): 4442-4446.
108. **Jamshidi Y**, Flavell DM, Hawe E, MacCallum PK, Meade TW, Humphries SE. Genetic determinants of the response to bezafibrate treatment in the lower extremity arterial disease event reduction (LEADER) trial. *Atherosclerosis*. 2002; 163(1): 183-192.
109. **Jørgensen T**, Borch-Johnsen K, Thomsen TF, Ibsen H, Glumer C, Pisinger C. A randomizes non-pharmacological intervention study for prevention of ischaemic heart disease: Baseline results Inter99 (1). *Eur J cardiovasc Prev Rehab*. 2003; 10(5): 377-386.
110. **Kalarchian MA**, Marcus MD, Wilson GT, Labouvie EW, Brolin RE, LaMarca LB. Binge eating among gastric bypass patients at long-term follow-up. *Obes Surg*. 2002; 12(2): 270-275.
111. **Kamegai J**, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I. Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes*. 2001; 50(11): 2438-2443.

112. **Karvonen MK**, Pesonen U, Heinonen P, Laakso M, Rissanen A, Naukkarinen H, Valve R, Uusitupa MI, Koulu M. Identification of new sequence variants in the leptin gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83(9): 3239-3242.
113. **Kask A**, Rago L, Wikberg JE, Schiöth HB. Evidence for involvement of the melanocortin MC4 receptor in the effects of leptin on food intake and body weight. *Eur J Pharmacol.* 1998; 360(1): 15-19.
114. **Kim BH**, Won YS, Kim EY, Yoon M, Nam KT, Oh GT, Kim DY. Phenotype of peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α) deficient mice on mixed background fed high fat diet. *J Vet Sci.* 2003; 4(3): 239-244.
115. **Klausen B**, Toubro S, Astrup A. Age and sex effects on energy expenditure. *Am J Clin Nutr.* 1997; 65(4): 895-907.
116. **Kobayashi H**, Ogawa Y, Shintani M, Ebihara K, Shimodahira M, Iwakura T, Hino M, Ishihara T, Ikekubo K, Kurahachi H, Nakao K. A novel homozygous missense mutation of melanocortin-4 receptor (MC4R) in a Japanese woman with severe obesity. *Diabetes.* 2002; 51(1): 243-246.
117. **Kobzová J**, Vignerová J, Bláha P, Krejčovský L, Riedlová J. The 6th nationwide anthropological survey of children and adolescents in the Czech Republic in 2001. *Cent Eur J Public Health.* 2004; 12(3): 126-130.
118. **Kohno D**, Gao HZ, Muroya S, Kikuyama S, Yada T. Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca²⁺ signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. *Diabetes.* 2003; 52(4): 948-956.
119. **Kojima M**, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing peptide from stomach. *Nature.* 1999; 402 (6762): 656-660.
120. **Kojima M**, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev.* 2005; 85(2): 495-522.
121. **Korbonits M**, Goldstone AP, Gueorguiev M, Grossman AB. Ghrelin – a hormone with multiple functions. *Front Neuroendocrinol.* 2004; 25(1): 27-68.
122. **Kowalski TJ**, Spar BD, Markowitz L, Maguire M, Golovko A, Yang S, Farley C, Cook JA, Tetzloff G, Hoos L, Del Vecchio RA, Kazdoba TM, McCool MF, Hwa JJ, Hyde LA, Davis H, Vassileva G, Hedrick JA, Gustafson EL. Transgenic overexpression of neuromedin U promotes leanness and hypophagia in mice. *J Endocrinol.* 2005; 185(1): 151-164.
123. **Krude H**, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet.* 1998; 19(2): 155-157.
124. **Krude H**, Biebermann H, Schnabel D, Tansek MZ, Theunissen P, Mullis PE, Gruters A. Obesity due to proopiomelanocortin deficiency: three new cases and treatment trials with thyroid hormone and ACTH4-10. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88(10): 4633-4640.
125. **Krude H**, Gruters A. Implications of proopiomelanocortin (POMC) mutations in humans: the POMC deficiency syndrome. *Trends Endocrinol Metab.* 2000; 11(1): 15-22.
126. **Lacquemant C**, Lepretre F, Torra IP, Manraj M, Charpentier G, Ruiz J, Staels B, Froguel P. Mutation screening of the PPAR α gene in type 2 diabetes associated with coronary heart disease. *Diabetes Metab.* 2000; 26(5): 393-401.
127. **Larsen LH**, Echwald SM, Sorensen TI, Andersen T, Wulff BS, Pedersen O. Prevalence of mutations and functional analyses of melanocortin 4 receptor variants identified among 750 men with juvenile-onset obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(1): 219-224.
128. **Larsen TM**, Larsen LH, Torekov SK, Ek J, Black E, Toubro S, Astrup A, Sørensen TIA, Hansen T, Pedersen O. Identification of novel variants in the putative PPAR γ 2 promoter and studies of relationships with obesity in Danish men. *Obes Res.* 2005; 13(6): 953-958.
129. **Lee GH**, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature.* 1996; 379(6566): 632-635.
130. **Lee YS**, Poh LK, Loke KY. A novel melanocortin 3 receptor gene (MC3R) mutation associated with severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87(3): 1423-1426.
131. **Licinio J**, Caglayan S, Ozata M, Yildiz BO, de Miranda PB, O’Kirwan F, Whitby R, Liang L, Cohen P, Bhasin S, Krauss RM, Veldhuis JD, Wagner AJ, DePaoli AM, McCann SM, Wong ML. Phenotypic effects of leptin replacement of morbid obesity, diabetes mellitus, hypogonadism and behavior in leptin-deficient adults.

- Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101(13): 4531-4536.
132. **Lubrano-Berthelier C**, Dubern B, Lacorte JM, Picard F, Shapiro A, Zhang S, Bertrais S, Herberg S, Basdevant A, Clement K, Vaisse C. Melanocortin 4 receptor mutations in a large cohort of severely obese adults: prevalence, functional classification, genotype-phenotype relationships, and lack of association with binge eating. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(5): 1811-1818.
133. **Lubrano-Berthelier C**, Durand E, Dubern B, Shapiro A, Dazin P, Weill J, Ferron C, Froguel P, Vaisse C. Intracellular retention is a common characteristics of childhood obesity-associated MC4R mutations. *Hum Mol Genet.* 2003; 12(2): 145-153.
134. **Lubrano-Berthelier C**, Le Stunff C, Bougneres P, Vaisse C. A homozygous null mutation delineates the role of the melanocortin-4 receptor in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(5): 2028-2032.
135. **Ma L**, Tataranni PA, Bogardus C, Baier LJ. Melanocortin 4 receptor gene variation is associated with severe obesity in Pima Indians. *Diabetes.* 2004; 53(10): 2696-2699.
136. **Mackenzie RG**. Obesity-associated mutations in the human melanocortin-4 receptor gene. *Peptides.* 2006; 27(2): 395-403.
137. **Maffei M**, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med.* 1995; 1(11): 1155-1161.
138. **Marks DL**, Boucher N, Lanouette CM, Perusse L, Brookhart G, Comuzzie AG, Chagnon YC, Cone RD. Ala67Thr polymorphism in the Agouti-related peptide gene is associated with inherited leanness in humans. *Am J Med Genet A.* 2004; 126(3): 267-271.
139. **Mayfield DK**, Brown AM, Page GP, Garvey WT, Shriver MD, Argyropoulos G. A role for the Agouti-related protein promoter in obesity and type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 287(2): 568-573.
140. **Maynard LM**, Guo SS, Chumlea WC, Roche AF, Wisemandle WA, Zeller CM, Towne B, Siervogel RM. Total-body and regional bone mineral content and areal bone mineral density in children aged 8-18y: the Fels Longitudinal Study. *Am J Clin Nutr.* 1998; 68(5): 1111-1117.
141. **McGarry JD**. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes.* 2002; 51(1): 7-18.
142. **McKee KK**, Palyha OC, Feighner SD, Hreniuk DL, Tan CP, Phillips MS, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD. Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Mol Endocrinol.* 1997; 11(4): 415-423.
143. **Mergen M**, Mergen H, Ozata M, Oner R, Oner C. A novel melanocortin 4 receptor (MC4R) gene mutation associated with morbid obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86(7): 3448-3451.
144. **Michaud EJ**, Bultman SJ, Klebig ML, van Vugt MJ, Stubbs LJ, Russell LB, Woychik RP. A molecular model for the genetic and phenotypic characteristics of the mouse lethal yellow (Ay) mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91(7): 2562-2566.
145. **Miller MW**, Duhl DM, Vrieling H, Cordes SP, Ollmann MM, Winkes BM, Barsh GS. Cloning of the mouse agouti gene predicts a secreted protein ubiquitously expressed in mice carrying the lethal yellow mutation. *Genes Dev.* 1993; 7(3): 454-467.
146. **Miraglia del GE**, Cirilio G, Santoro A, D'Urso L, Carbone MT, Di Toro R, Perrone L. Molecular screening of the proopiomelanocortin (POMC) gene in Italian obese children: report of three new mutations. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001; 25(1): 61-67.
147. **Miyasaka K**, Hosoya H, Sekime A, Ohta M, Amono H, Matsushita S, Suzuki K, Higuchi S, Funakoshi A. Association of ghrelin receptor gene polymorphism with bulimia nervosa in a Japanese population. *J Neural Transm.* 2006; 113(9): 1279-1285.
148. **Montague CT**, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature.* 1997; 397(6636): 903-908.
149. **Moran O**, Phillip M. Leptin: obesity, diabetes and other peripheral effects – a review. *Pediatric Diabetes.* 2003; 4(2): 101-109.
150. **Mountjoy KG**, Mortrud MT, Low MJ, Simerly RB, Cone RD. Localisation of the

- melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol.* 1994; 8(10): 1298-1308.
151. **Mountjoy KG**, Robbins LS, Mortrud MT, Cone RD. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science.* 1992; 257(5074): 1248-1251.
152. **Mountjoy KG**, Wong J. Obesity, diabetes and functions for proopiomelanocortin-derived peptides. *Mol Cell Endocrinol.* 1997; 128(1-2): 171-177.
153. **Mozid AM**, Tringali G, Forsling ML, Hendricks MS, Ajodha S, Edwards R, Navarra P, Grossman AB, Korbonits M. Ghrelin is released from rat hypothalamic explants and stimulates corticotrophin-releasing hormone and arginine-vasopressin. *Horm Metab Res.* 2003; 35(8): 455-459.
154. **Møller A**. Food composition tables 1989. National Food Agency of Denmark, Copenhagen.
155. **Murdolo G**, Lucidi P, Di Loreto C, Parlanti N, De Cicco A, Fatone CG, Bolli GB, Santeusani F, De Feo P. Insulin is required for prandial ghrelin suppression in humans. *Diabetes.* 2003; 52(12): 2923-2927.
156. **Naggert JK**, Fricker LD, Varlamov O, Nishina PM, Rouille Y, Steiner DF, Carroll RJ, Paigen BJ, Leiter EH. Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nat Genet.* 1995; 10(2): 135-142.
157. **Nakazato M**, Hanada R, Murakami N, Date Y, Mondal MS, Kojima M, Yoshimatsu H, Kangawa K, Matsukura S. Central effects of neuromedin U in the regulation of energy homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 277(1): 191-194.
158. **Nakazato M**, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature.* 2001; 409(6817): 194-198.
159. **Neary NM**, Small CJ, Wren AM, Lee JL, Druce MR, Palmieri C, Frost GS, Ghatei MA, Coombes RC, Bloom SR. Ghrelin increases food intake in cancer patients with impaired appetite: Acute, randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(6): 2832-2836.
160. **Neel JV**. Diabetes mellitus: a „thrifty“ genotype rendered detrimental by „progress“? *Am J Hum Genet.* 1962; 14: 353-362.
161. **Nielsen EMD**, Hansen L, Echwald SM, Drivsholm T, Borch-Johnsen K, Ekstrøm CT, Hansen T, Pedersen O. Evidence for an association between the Leu162Val polymorphism of the PPAR α gene and decreased fasting serum triglyceride levels in glucose tolerant subjects. *Pharmacogenetics.* 2003; 13: 417-423.
162. **Nijenhuis WA**, Oosterom J, Adan RA. AgRP (83-132) acts as an inverse agonist on the human-melanocortin-4 receptor. *Mol Endocrinol.* 2001; 15(1): 164-171.
163. **O'Donohue TL**, Dorsa DM. The opiomelanotropinergic neuronal and endocrine system. *Peptides.* 1982; 3(3): 353-395.
164. **Ohman M**, Oksanen L, Kainulainen K, Janne OA, Kaprio J, Koskenvuo M, Mustajoki P, Kontula K, Peltonen L. Testing of human homologues of murine obesity genes as candidate regions in Finnish obese sib pairs. *Eur J Hum Genet.* 1999; 7(2): 117-124.
165. **Ohshiro Y**, Sanke T, Ueda K, Shimajiri Y, Nakagawa T, Tsunoda K, Nishi M, Sasaki H, Takasu N, Nanjo K. Molecular scanning for mutations in the melanocortin-4 receptor gene in obese/diabetic Japanese. *Ann Hum Genet.* 1999; 63(6): 483-487.
166. **Ollmann MM**, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, Barsch GS. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science.* 1997; 278(5335): 135-138.
167. **Oosterom J**, Nijenhuis WA, Schaaper WM, Slootstra J, Melen RH, Gispen WH, Burbach JP, Adan RA. Conformation of the core sequence in melanocortin peptides directs selectively for the melanocortin MC3 and MC4 receptors. *J Biol Chem.* 1999; 274(24): 16853-16860.
168. **O'Rahilly S**. Leptin: defining its role in humans by the clinical study of genetic disorders. *Nutr Rev* 2002; 60(10 Pt2): 30-34.
169. **O'Rahilly S**, Farooqi IS, Yeo GSH, Challis BG. Minireview: Human obesity-lessons from monogenic disorders. *Endocrinology.* 2003; 144(9): 3757-3764.
170. **Ozata M**, Ozdemir IC, Licinio J. Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of

- leptin-mediated defects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84(10): 3686-3695.
171. **Pantel J**, Legendre M, Cabrol S, Hilal L, Hajaji Y, Morisset S, Nivot S, Vie-Luton MP, Grouselle D, de Kerdanet M, Kadiri A, Epelbaum J, Le Bouc Y, Amselem S. Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature. *J Clin Invest.* 2006; 116(3): 760-768.
172. **Palyha OC**, Feighner SD, Tan CP, McKee KK, Hreniuk DL, Gao YD, Schleim KD, Yang L, Morriello GJ, Nargund R, Patchett AA, Howard AD, Smith RG. Ligand activation domain of human orphan growth hormone (GH) secretagogue receptor (GHS-R) conserved from Pufferfish to humans. *Mol Endocrinol.* 2000; 14(1): 160-169.
173. **Pelleymounter MA**, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science.* 1995; 269(5223): 540-543.
174. **Pérusse L**, Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, Snyder EE, Bouchard C. The human obesity gene map: the 2004 update. *Obes Res.* 2005; 13(3): 381-490.
175. **Peters JM**, Hennuyer N, Staels B, Fruchart J, Fievet C, Gonzales FJ, Auwerx J. Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor α -deficient mice. *J Biol Chem.* 1997; 272(43): 27307-27312.
176. **Pritchard JK**, Stephens M, Donnelly PJ. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 2000; 155(2): 945-959.
177. **Pritchard LE**, Turnbull AV, White A. Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity. *J Endocrinol.* 2002; 172(3): 411-421.
178. **Rached M**, Buronfosse A, Begeot M, Penhoat A. Inactivation and intracellular retention of the human I183N mutated melanocortin 3 receptor associated with obesity. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1689(3): 229-234.
179. **Rankinen T**, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, Perusse L, Bouchard C. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring).* 2006; 14(4): 529-644.
180. **Ravussin E**, Valencia ME, Esparza J, Bennett PH, Schulz LO. Effects of a traditional lifestyle on obesity in Pima Indians. *Diabetes Care.* 1994; 17(9): 1067-1074.
181. **Reizes O**, Benoit SC, Strader AD, Clegg DJ, Akunuru S, Seeley RJ. Syndecan-3 modulates food intake by interacting with the melanocortin/AgRP pathway. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 994: 66-73.
182. **Robitaille J**, Brouillette C, Houde A, Lemieux S, Perusse L, Tchernof A, Gaudet D, Vohl MC. Association between the PPAR α -L126V polymorphism and components of the metabolic syndrome. *J Hum Genet.* 2004; 49(9): 482-489.
183. **Rosmond R**, Chagnon M, Bouchard C, Bjorntorp P. A missense mutation in the human melanocortin-4 receptor gene in relation to abdominal obesity and salivary cortisol. *Diabetologia.* 2001; 44(10): 1335-1338.
184. **Santini F**, Maffei M, Ceccarini G, Pelosini C, Scartabelli G, Rosellini V, Chiellini C, Marsili A, Lisi S, Tonacchera M, Agretti P, Chiovato L, Mammoli C, Vitti P, Pinchera A. Genetic screening for melanocortin-4 receptor mutations in a cohort of Italian obese patients: description and functional characterization of a novel mutation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(2): 904-908.
185. **Santoro N**, Perrone L, Cirillo G, Raimondo P, Amato A, Coppola F, Santarpia M, D'Aniello A, Miraglia Del Giudice E. Weight loss in obese children carrying the proopiomelanocortin R236G variant. *J Endocrinol Invest.* 2006; 29(3): 226-230.
186. **Sapone A**, Peters JM, Sakai S, Tomita S, Papiha SS, Dai R, Friedman FK, Gonzales FJ. The human peroxisome proliferator-activated receptor α gene: identification and functional characterization of two natural allelic variants. *Pharmacogenetics.* 2000; 10(4): 321-333.
187. **Schallin-Jantti C**, Valli-Jaakola K, Oksanen L, Martelin E, Laitinen K, Krusius T, Mustajoki P, Heikinheimo M, Kontula K. Melanocortin-3-receptor gene variants in morbid obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003; 27(1): 70-74.
188. **Schoonjans K**, Staels B, Auwerx J. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res.* 1996; 37(5): 907-925.
189. **Schwartz TW**, Frimurer TM, Holst B, Rosenkilde MM, Elling CE. Molecular mechanism of 7TM receptor activation – a global toggle switch model. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2006; 46: 481-519.

190. **Schwartz MW**, Seeley RJ, Woods SC, Weigle DS, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes*. 1997; 46(12): 2119-2123.
191. **Sher T**, Yi HF, McBride OW, Gonzales FJ. cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry*. 1993; 32(21): 5598-5604.
192. **Shintani M**, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, Hosoda K, Hayashi T, Inoue G, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Ghrelin is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 pathway. *Diabetes*. 2001; 50(6): 227-232.
193. **Shinyama H**, Masuzaki H, Fang H, Flier JS. Regulation of melanocortin-4 receptor signaling: agonist-mediated desensitization and internalization. *Endocrinology*. 2003; 144(4): 1301-1314.
194. **Shuto Y**, Shibasaki T, Otagiri A, Kuriyama H, Ohata H, Tamura H, Kamegai J, Sugihara H, Oikawa S, Wakabayashi I. Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding, and adiposity. *J Clin Invest*. 2002; 109(11): 1429-1436.
195. **Sina M**, Hinney A, Ziegler A, Neupert T, Mayer H, Siegfried W, Blum WF, Remschmidt H, Hebebrand J. Phenotypes in three pedigrees with autosomal dominant obesity caused by haploinsufficiency mutations in the melanocortin-4 receptor gene. *Am J Hum Genet*. 1999; 65(6): 1501-1507.
196. **Spiegelman BM**, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*. 2001; 104(4): 531-543.
197. **Srinivasan S**, Lubrano-Berthelier C, Govaerts C, Picard F, Santiago P, Conklin BR, Vaisse C. Constitutive activity of the melanocortin-4 receptor is maintained by its N-terminal domain and plays a role in energy homeostasis in humans. *J Clin Invest*. 2004; 114(8): 1158-1164.
198. **Stettler N**. Comment: The global epidemic of childhood obesity: is there a role for the paediatrician? *Obes Rev*. 2004; 5: 1-3.
199. **Strader AD**, Reizes O, Woods SC, Benoit SC, Seeley RJ. Mice lacking the syndecan-3 gene are resistant to diet-induced obesity. *J Clin Invest*. 2004; 114(9): 1354-1360.
200. **Strobel A**, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet*. 1998; 18(3): 213-215.
201. **Stunkard AJ**, Messick S. The three-factor eating questionnaire to measure dietary restraint, disinhibition and hunger. *J Psychosom Res*. 1985; 29(1): 71-83.
202. **Sundaramurthy D**, Campbell DA, Leek JP, Markham AF, Pieri LF. Assignment of the melanocortin 4 receptor (MC4R) gene to human chromosome band 18q22 by in situ hybridisation and radiation hybrid mapping. *Cytogenet Cell Genet*. 1998; 82(1-2): 97-98.
203. **Tai ES**, Demissie S, Cupples LA, Corella D, Wilson PW, Schaefer EJ, Ordovas JM. Association between the PPARA L162V polymorphism and plasma lipid levels: the Framingham offspring study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22(5): 805-810.
204. **Tao YX**. Molecular mechanisms of the neural melanocortin receptor dysfunction in severe early onset obesity. *Mol Cell Endocrinol*. 2005; 239(1-2): 1-14.
205. **Tao YX**, Segaloff DL. Functional characterization of melanocortin-3 receptor variants identify a loss-of-function mutation involving an amino acid critical for G protein-coupled receptor activation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89(8): 3936-3942.
206. **Tartaglia LA**, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 1995; 83(7): 1263-1271.
207. **Tatro JB**, Entwistle ML, Lester BR, Reichlin S. Melanotropin receptors of murine melanoma characterized in cultured cells and demonstrated in experimental tumors in situ. *Cancer Res*. 1990; 50(4): 1237-1242.
208. **Tchop M**, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes*. 2001; 50(4): 707-709.
209. **Toshinai K**, Date Y, Murakami N, Shimada M, Mondal MS, Shimbara T, Guan JL, Wang QP, Funahashi H, Sakurai T, Shioda S, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology*. 2003; 144(4): 1506-1512.
210. **Vaisse C**, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P. A frameshift mutation in human

- MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nature*. 1998; 20(2): 113-114.
211. **Vaisse C**, Clement K, Durand E, Hercberg S, Guy-Grand B, Froguel P. Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest*. 2000; 106(2): 253-262.
212. **VanLeeuwen D**, Steffey ME, Donahue C, Ho G, MacKenzie RG. Cell surface expression of the melanocortin-4 receptor is dependent on a C-terminal diisoleucine sequence at codons 316/317. *J Biol Chem*. 2003; 278(18): 15935-15940.
213. **Varanasi U**, Chu R, Huang Q, Castellon R, Yeldani AV, Reddy JK. Identification of a peroxisome proliferator-responsive element upstream of the human peroxisomal fatty acyl coenzyme A oxidase gene. *J Biol Chem*. 1996; 271(4): 2147-2155.
214. **Vicennati V**, Geroni L, Genghini S, Patton L, Pagotto U, Pasquali R. Sex difference in the relationship between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sex hormones in obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2006; 14(2): 235-243.
215. **Vink T**, Hinney A, van Elburg AA, van Goozen SH, Sandkuijl LA, Sinke RJ, Herpertz-Dahlmann BM, Hebebrand J, Remschmidt H, van Engeland H, Adan RA. Association between an agouti-related protein gene polymorphism and anorexia nervosa. *Mol Psychiatry*. 2001; 6(3): 325-328.
216. **Vohl MC**, Lepage P, Gaudet D, Brewer CG, Bétard C, Perron P, Houde G, Cellier C, Faith JM, Després JP, Morgan K, Hudson TJ. Molecular scanning of the human PPAR α gene: association of the L162V mutation with hyperapobetalipoproteinemia. *J Lipid Res*. 2000; 41(6): 945-952.
217. **Wajnrach MP**, Ten IS, Gertner JM, Leubel RL. Genomic organization of the human ghrelin gene. *J Endocrinol Genet*. 2000; 1: 231-233.
218. **Wang HJ**, Geller F, Dempfle A, Schauble N, Fridel S, Lichtner P, Fontenla-Horro F, Wudy S, Hagemann S, Gortner L, Huse K, Remschmidt H, Bettecken T, Meitinger T, Schafer H, Hebebrand J, Hinney A. Ghrelin receptor gene: identification of several sequence variants in extremely obese children and adolescents, healthy normal-weight and underweight students, and children with short normal stature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89(1): 157-162.
219. **Whitfield PL**, Seeburg PH, Shine J. The human pro-opiomelanocortin gene. *DNA*. 1982; 143(1): 133-143.
220. **Willesen MG**, Kristensen P, Romer J. Colocalization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology*. 1999; 70(5): 306-316.
221. **World Health Organization**. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva 1999.
222. **World Health Organization**. Report of a WHO Expert Committee. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. World Health Organ Tech Rep Ser, Geneva: World Health Organization. 1995; 854: 429-431.
223. **Wren AM**, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, Kennedy AR, Roberts GH, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology*. 2000; 141(11): 4325-4328.
224. **Wren AM**, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillo WS, Ghatei MA, Bloom SR. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86(12): 5992.
225. **Wren AM**, Small CJ, Abbot CR, Jethwa PH, Kennedy AR, Murphy KG, Stanley SA, Zollner AN, Ghatei MA, Bloom SR. Hypothalamic actions of neuromedin U. *Endocrinology*. 2002; 143(11): 4227-4234.
226. **Xiang Z**, Litherland SA, Sorensen NB, Proneth B, Wood MS, Shaw AM, Millard WJ, Haskell-Luevano C. Pharmacological characterization of 40 human melanocortin-4 receptor polymorphisms with the endogenous proopiomelanocortin-derived agonists and the agouti-related protein (AGRP) antagonist. *Biochemistry*. 2006; 45(23): 7277-7288.
227. **Yeo GSH**, Farooqi IS, Aminian S, Halsall DJ, Stanhope RG, O'Rahilly S. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nature*. 1998; 20(2): 111-112.
228. **Yeo GS**, Connie Hung CC, Rochford J, Keogh J, Gray J, Sivaramakrishnan S, O'Rahilly S, Farooqi IS. A de novo mutation affecting human TRKB associated with severe obesity and development delay. *Nat Neurosci*. 2004; 7(11): 1187-1189.

229. **Young EH**, Wareham NJ, Farooqi S, Hinney A, Hebebrand J, Scherag A, O'Rahilly S, Barroso I, Sandhu MS. The V103I polymorphism of the MC4R gene and obesity: population based studies and meta-analysis of 29 563 individuals. *Int J Obes (Lond)* (v tisku).
230. **Zhang ZH**, Felder RB. Melanocortin receptors mediate the excitatory effects of blood-borne murine leptin on hypothalamic paraventricular neurons in rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004; 286(2): 303-310.
231. **Zhang Y**, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994; 372(6505): 425-432.
232. **Zhou A**, Bloomquist BT, Mains RE. The prohormone convertases PC1 and PC2 mediate distinct endoproteolytic cleavages in a strict temporal order during proopiomelanocortin biosynthesis processing. *J Biol Chem*. 1993; 268(3): 1763-1769.

11. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACTH	adrenokortikotropní hormon
AgRP	agouti-related peptide
alpha-MSH	alfa-melanocyty stimulující hormon
ARC	nucleus arcuatus
BBS	Bardet-Biedlův syndrom
beta1-AR	beta1-adrenergní receptor
beta2-AR	beta2-adrenergní receptor
beta3-AR	beta3-adrenergní receptor
beta-MSH	beta-melanocyty stimulující hormon
BMI	index tělesné hmotnosti
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CART	cocaine-amphetamine related transcript
CNS	centrální nervový systém
CRH	kortikoliberin
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
CRHR1	receptor kortikoliberinu 1
CRHR2	receptor kortikoliberinu 2
dHPLC	denaturační vysokoúčinná kapalinová chromatografie
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
gama-MSH	gama-melanocyty stimulující hormon
GABA	gama-aminobutyrová kyselina
GHSR	growth hormone secretagogue receptor (receptor pro sekretagogy růstového hormonu)
GIT	gastrointestinální trakt
GRL	receptor glukokortikoidů
IGF	inzulínu podobný růstový faktor, insulin-like growth factor
INSR	inzulínový receptor
LEP	leptin
LEPR	leptinový receptor
LH	laterální hypothalamus
MCR	melanokortinový receptor
MC1R	melanokortinový receptor 1. typu
MC2R	melanokortinový receptor 2. typu
MC3R	melanokortinový receptor 3. typu
MC4R	melanokortinový receptor 4. typu
MC5R	melanokortinový receptor 5. typu
MCH	melanin koncentrující hormon
MCHR1	receptor melanin koncentrujícího hormonu 1
NMU	neuromedin U
NPY	neuropeptid Y
PC1	prohormon konvertáza 1
PC2	prohormon konvertáza 2
PCR	polymerázová řetězová reakce
PHP1A	pseudohypoparathyreóza typu 1A
POMC	proopiomelanokortin
PPAR-alfa	peroxisome proliferator-activated receptor-alpha
PPARA	gen kódující peroxisome proliferator-activated receptor-alpha

PVN	paraventriculární nucleus
PYY₃₋₃₆	peptid YY ₃₋₃₆
PWS	syndrom Pradera-Williho
SIM1	Single Minded Homologue 1
SNP	jednonukleotidové polymorfismy
TRH	thyrotropin uvolňující hormon
UCP	rozpřahovací bílkovina (uncoupling protein)
VMH	ventromediální hypothalamus
WT	wild-type
Y1R	Y1 receptor
Y2R	Y2 receptor

12. PŘEHLED VLASTNÍCH PUBLIKACÍ A ODBORNÝCH OCENĚNÍ

12.1. Původní články v časopisech s faktorem impaktu

- 1) Hainerová I, Torekov SS, Ek J, Finková M, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Madsen OD, Lebl J, Hansen T, Pedersen O. *Association between Neuromedin U gene variants and overweight and obesity*. J Clin Endocrinol Metab. 2006; 91(12): 5057-5063 **IF: 6,020**
- 2) Sparso T, Hussain MS, Andersen G, Hainerová I, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Hansen T, Pedersen O. *Relationships between the functional PPAR α Leu162Val polymorphism and obesity, type 2 diabetes, dyslipidaemia, and related quantitative traits in studies of 7,259 middle-aged white people*. Mol Genet Metab. 2007; 90(2): 205-209. **IF: 2,678**
- 3) Hainerová I, Larsen LH, Holst B, Finková M, Hainer V, Lebl J, Hansen T, Pedersen O. *Melanocortin 4 receptor mutations in obese Czech children: studies of prevalence, phenotype development, weight reduction response and functional analysis*. J Clin Endocrinol Metab. 2007; 92(9): 3689-3696. **IF: 6,020**

12.2. Přehledové články v časopisech bez faktoru impaktu

- 1) Hainerová I. *Vznik obezity na základě mutací genů ovlivňující energetickou bilanci*. Cas Lek Cesk. 2007; 146(3): 240-245.
- 2) Hainer V, Bendlová B, Hainerová I, Kunešová M, Aldhoon B. *Úloha genetických faktorů v patogenezi a léčbě obezity*. DMEV. 2006; 9(Suppl.1): 56-64.
- 3) Lebl J, Hainerová I. *Diferenciální diagnostika obezity v dětském věku*. Vox paediatricae. 2005; 9(5): 14-16.
- 4) Hainerová I, Lebl J. *Monogenní formy obezity*. DMEV. 2004; 7(4): 188-193.

12.3. Kapitoly v monografiích

- 1) Hainerová I, Larsen LH, Finková M, Hainer V, Lebl J, Hansen T, Pedersen O. *Zbyněk, který utrácí své kapesné za jídlo*. In: Jan Lebl, Milan Macek Jr. (eds) *Kazuistiky z molekulární genetiky*, 1. vyd. Galén, Praha, 2006, s. 65-66.
- 2) Lebl J, Hainerová I *Obezita u dětí* In: Lebl J, Zapletalová J, Koloušková S (eds) *Dětská endokrinologie*, 1. vyd. Galén, Praha, 2004, s. 191-197.
- 3) Hainerová I. *Genetické faktory v etiopatogenezi obezity* In: Pařízková J, Lisá L (eds) *Obezita u dětí a dospívajících*, 1. vyd. Galén, Praha, 2007 (v tisku).

12.4. Publikace v recenzním řízení

- 1) Larsen LH, Gjesing AP, Torekov SS, Hainerová I, Johansen A, Albrechtsen A, Boj S, Holst B, Harper A, Urhammer SA, Hamid YH, Black E, Glümer C, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Holst JJ, Echwald SM, Eiberg H, Astrup A, Sørensen TIA, Lebl J, Schwartz TW, Hansen T, Pedersen O. *Family- and population-based studies of genetic variation of the ghrelin receptor and relationships to obesity*. Nabídnuto k publikaci v J Clin Endocrinol Metab

12.5. Přednášky, postery, abstrakta

→ zahraniční a mezinárodní:

- 1) Hainerová I, Torekov SS, Ek J, Finková M, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Lebl J, Hansen T, Pedersen O. *The first identified variants in the Neuromedin U gene (NMU) associate with overweight and obesity in humans: studies of 6,224 Caucasians*. Int J Obes. 2007; 31 (Suppl. 1): 19.
 - přednáška na 15th European Congress on Obesity, Budapešť, Maďarsko, duben 2007
- 2) Hainerová I, Lebl J, Hainer V, Finková M, Larsen LL, Hansen T, Pedersen O. *Mutation in melanocortin 4 receptor (MC4R) in Czech obese children: prevalence, phenotype and weight reduction of the carriers*. Obes Rev. 2006; 7(Suppl.2): 163.
 - poster na 10th International Congress on Obesity, Sydney, Austrálie, září 2006
- 3) Hainerová I, Torekov SS, Ek J, Finková M, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Lebl J, Hansen T, Pedersen O. *The first identified variants in the neuromedin U gene associate with overweight and obesity in humans*. Slov Pediatr. 2006; 13(3): 172.
 - přednáška na 13th Annual Meeting of the Middle European Society For Paediatric Endocrinology (MESPE), Portorož, Slovinsko, říjen 2006
- 4) Hainerová I, Larsen LH, Finková M, Hainer V, Lebl J, Hansen T, Pedersen O. *Frequency of melanocortin 4 receptor (MC4R) mutations and investigation of the MC4R syndrome in Czech children*. DMEV. 2005; 8(Suppl. 2): 15-16.
 - přednáška na 12th Annual Meeting of the Middle European Society for Paediatric Endocrinology (MESPE), Mikulov, říjen 2005

→ tuzemské::

- 1) Hainerová I, Larsen LH, Finková M, Hainer V, Lebl J, Hansen T, Pedersen O. *První skřínink genu pro Neuromedin U (NMU) – varianty asociují s nadváhou a obezitou u lidí*.

- přednáška: Dny dětské endokrinologie, Ostrava, březen 2007
- 2) Hainerová I, Torekov SS, Ek J, Finková M, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Lebl J, Hansen T, Pedersen O. *The first identified variants in the Neuromedin U gene (NMU) associate with overweight and obesity in humans: studies of 6,224 Caucasians.*
 - přednáška: 3rd International Medical Postgraduate Conference – New Frontiers in the Research of PhD Students, Hradec Králové, listopad 2006, abstrakt ve sborníku, s.23-26.
 - 3) Hainerová I, Larsen LH, Finková M, Hainer V, Lebl J, Hansen T, Pedersen O. *Melanokortinový receptor 4.typu u obézních dětí: prevalence, klinická charakteristika a hmotnostní úbytek.*
 - přednáška: VII. Český pediatrický kongres s mezinárodní účastí, Praha, červen 2006
 - 4) Lebl J, Hainerová I. *Humorální regulace příjmu potravy a etiopatogeneze obezity.*
 - panelová diskuze: 3. hradecký postgraduální kurz v endokrinologii, Hradec Králové, květen 2006, abstrakt ve sborníku, s. 102-103.
 - 5) Hainerová I, Larsen LH, Finková M, Hainer V, Lebl J, Hansen T, Pedersen O. *Obezita na podkladě mutací genu MC4R: nový pohled na etiopatogenezi nadváhy.* DMEV. 2006; 9 (Suppl.2): 23.
 - přednáška: 42. diabetologické dny v Luhačovicích, duben, 2006
 - 6) Hainerová I, Lebl J. *Fyziologie a patofyziologie regulace příjmu potravy.*
 - přednáška: Dny dětské endokrinologie 2006, Chodová Planá, březen 2006, abstrakt ve sborníku, s.17.
 - 7) Hainerová I, Larsen LH, Finková M, Hainer V, Lebl J, Hansen T, Pedersen O. *Mutace melanokortinového receptoru 4.typu u obézních dětí.*
 - přednáška: XXVIII. endokrinologické dny s mezinárodní účastí, Olomouc, říjen 2005, abstrakt ve sborníku, s.34.
 - 8) Hainerová I, Larsen LH, Finková M, Hainer V, Lebl J, Hansen T, Pedersen O. *Melanokortinový receptor 4.typu u obézních dětí - prevalence, klinická charakteristika a hmotnostní úbytek.*
 - přednáška: Obezitologie 2005, Luhačovice, říjen 2005, abstrakt ve sborníku, s.58.
 - 9) Hainerová I, Lebl J. *Regulace jídelního chování.*
 - přednáška: Pracovní dny dětské diabetologie, Karlovy Vary, září 2005
 - 10) Hainerová I, Lebl J. *Monogenní formy obezity u dětí.*
 - přednáška: Páté setkání pracovní skupiny dětské endokrinologie ČPS – „50 let české dětské endokrinologie, Jindřichův Hradec, leden 2004
 - 11) Hainerová I. *Monogenně podmíněné formy obezity u dětí.*

- přednáška: Pracovní den Společnosti lékařské genetiky (Kaprasův den), Praha, březen 2004

12.6. Odborná ocenění

- Cena společnosti Pfizer za nejhodnotější původní práci českých autorů v oboru dětská endokrinologie publikovanou v zahraničním časopise v roce 2006 – vítěz v kategorii věku do 35 let (uděleno v rámci Dnů dětské endokrinologie 2007, Ostrava, březen 2007)
- 2. místo v sekci základní vědecká činnost v rámci 3rd Hradec Králové Medical Postgraduate Conference, Hradec Králové, listopad 2006
- Ocenění za nejlepší přednášku (uděleno v rámci 13th Annual meeting of the Middle European Society for Paediatric Endocrinology (MESPE), Portorož, Slovinsko, říjen 2006)
- Ocenění za nejlepší přednášku (uděleno v rámci 12th Annual Meeting of the Middle European Society for Paediatric Endocrinology (MESPE), Mikulov, říjen 2005)

13. PŘÍLOHY

- 1) Hainerová I. *Genetické faktory v etiopatogenezi obezity* In: Pařízková J, Lisá L (eds) *Obezita u dětí a dospívajících*, 1.vyd. Galén, Praha, 2007 (v tisku).
- 2) Hainerová I. *Vznik obezity na základě mutací genů ovlivňující energetickou bilanci.* *Cas Lek Cesk.* 2007; 146(3): 240-245.
- 3) Hainer V, Bendlová B, Hainerová I, Kunešová M, Aldhoon B. *Úloha genetických faktorů v patogenezi a léčbě obezity.* *DMEV.* 2006; 9(Suppl.1): 56-64.
- 4) Hainerová I, Larsen LH, Finková M, Hainer V, Lebl J, Hansen T, Pedersen O. *Zbyněk, který utrácí své kapesné za jídlo.* In: Jan Lebl, Milan Macek Jr. (eds) *Kazuistiky z molekulární genetiky*, 1. vyd. Galén, Praha, 2006, s. 65-66.
- 5) Lebl J, Hainerová I. *Diferenciální diagnostika obezity v dětském věku.* *Vox pediatrics.* 2005; 9(5): 14-16.
- 6) Hainerová I, Lebl J. *Monogenní formy obezity.* *DMEV.* 2004; 7(4): 188-193
- 7) Lebl J, Hainerová I *Obezita u dětí* In: Lebl J, Zapletalová J, Koloušková S (eds) *Dětská endokrinologie*, 1. vyd. Galén, Praha, 2004, s. 191-197.