



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΘΕΜΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

**«ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ
ΚΑΙ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ»**

“GENETIC PREDISPOSING FACTORS AND OBESITY”



ΗΛΙΟΠΟΥΛΟΥ ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ

ΛΑΡΙΣΑ, 2019

Φορέα υλοποίησης της διπλωματικής μου εργασίας με θέμα «Γενετικοί Προδιαθεσικοί Παράγοντες και Παχυσαρκία», αποτέλεσε το Διαγνωστικό Κέντρο Μοριακής Βιολογίας και Κυτταρογενετικής ALFA LAB, του ομίλου ΥΓΕΙΑ.

Μέλη Τριμελούς Επιτροπής:

Τσέζου Ασπασία, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Μπαλατσός Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Σαραφίδου Θεολογία, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο : ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Εισαγωγικά στοιχεία	8
1.2 Δείκτης Μάζας Σώματος (ΔΜΣ) - Body Mass Index (BMI).....	9
1.3 Επιπτώσεις υπερβολικού βάρους και παχυσαρκίας.....	10
1.3.1 Αυξημένος κίνδυνος Σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2	10
1.3.2 Αυξημένος κίνδυνος Καρδιαγγειακών Παθήσεων	10
1.3.3 Αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης Καρκίνου	11
1.4 Παράγοντες εμφάνισης παχυσαρκίας	11
1.4.1 Διαταραχή ενεργειακού ισοζυγίου	11
1.4.2 Διατροφή και καθιστικός τρόπος ζωής	12
1.4.3 Ενδοκρινικά αίτια	12
1.4.4 Φαρμακευτικά αίτια.....	12
1.4.5 Γενετική της Παχυσαρκίας	13
1.4.5.1 Συνδρομική Παχυσαρκία.....	13
1.4.5.2 Μονογονιδιακή Παχυσαρκία.....	14
1.4.5.3 Πολυγονιδιακή Παχυσαρκία.....	15
1.4.5.3.1 FTO.....	15
1.4.5.3.1.2 FTO - rs9939609.....	16
1.4.5.3.2 MC4R.....	17
1.4.5.3.2.2 MC4R - rs7782313.....	17
1.4.5.3.3 NEGR1.....	18
1.4.5.3.3 NEGR1 - rs2815752.....	18

ΣΚΟΠΟΣ	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	20
2.1 Δειγματοληψία.....	21
2.2 Απομόνωση DNA	21
2.2.1 Αρχή της μεθόδου	21
2.2.2 Πρωτόκολλο Απομόνωσης DNA από κύτταρα στοματικού επιχρίσματος (Buccal Swab) στο ρομποτικό σύστημα QIAcube, της QIAGEN	21
2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	23
2.3.1 Αρχή της μεθόδου	23
2.3.2 Πρωτόκολλο Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)	24
2.4 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης.	26
2.4.1 Αρχή της μεθόδου	26
2.4.2 Πρωτόκολλο ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR.....	26
2.5. Γονοτύπηση Πολυμορφισμών.....	28
2.5.1 Καθαρισμός προϊόντων PCR.....	28
2.5.1.1 Αρχή της μεθόδου.....	28
2.5.1.2 Πρωτόκολλο καθαρισμού προϊόντων PCR.....	29
2.5.2. Αντίδραση SnapShot	30
2.5.2.1 Αρχή της μεθόδου.....	30
2.5.2.2 Πρωτόκολλο αντίδρασης SnapShot για τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς... ..	31
2.5.3 Απομάκρυνση ddNTPs από τα προϊόντα των SnapShot αντιδράσεων	33
2.5.4 Ηλεκτροφόρηση σημασμένων προϊόντων της SnapShot αντίδρασης, στον γενετικό αναλυτή και ανάλυση αποτελεσμάτων	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	34
3.1 Εξαγωγή και ανάλυση αποτελεσμάτων	34
3.2 Παρουσίαση και επεξεργασία αποτελεσμάτων	37
3.2.1 Παρουσίαση των αποτελεσμάτων γονοτύπησης των υπό μελέτη πολυμορφισμών.. ..	37
3.2.2 Επεξεργασία αποτελεσμάτων για τους πολυμορφισμούς rs9939609 του γονιδίου FTO, rs17782313 του γονιδίου MC4R και rs2815752 του γονιδίου NEGR1 σε Ελληνικό, γενικό πληθυσμό.....	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο : ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	44
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ^ο : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	50

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την διευθύντρια του εργαστηρίου ALFA LAB, Κα Λίνα Φλωρεντίν, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο συγκεκριμένο εργαστήριο αλλά και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου την παρούσα πτυχιακή εργασία.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλο το προσωπικό του εργαστηρίου ALFA LAB, τόσο στον τομέα της Μοριακής όσο και στον τομέα της Κυτταρογενετικής, καθώς μου παρείχαν ένα φιλικό και ευχάριστο περιβάλλον και παράλληλα ήταν πάντοτε πρόθυμοι να μου προσφέρουν κάθε βοήθεια και απαντήσεις σε ερωτήματα καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα, την Κα Νατάσα Κατσέλη, Βιολόγο του εργαστηρίου, για την υπερπολύτιμη βοήθεια της, την κατανόηση, υπομονή και καθημερινή καθοδήγηση της.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, την επιβλέπουσα Κα Ασπασία Τσέζου, τον συνεπιβλέπων Κο Νικόλαο Μπαλατσό και μέλος την Κα Θεολογία Σαραφίδου, για την συνεργασία μας και τον χρόνο που διέθεσαν για τη μελέτη της συγκεκριμένης εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση και ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Με εκτίμηση,

Σταυρούλα Ηλιοπούλου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το υπερβολικό βάρος και η παχυσαρκία σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), ορίζεται ως η ανώμαλη ή υπερβολική συσσώρευση λίπους με δυσμενείς επιπτώσεις για την υγεία, αυξάνοντας τον κίνδυνο για Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2, καρδιαγγειακές παθήσεις και για εμφάνιση πολλών τύπων Καρκίνου. Το αυξημένο βάρος και η παχυσαρκία είναι αποτέλεσμα διαφόρων παραγόντων. Συγκεκριμένα, η πλούσια σε λιπαρά διατροφή σε συνδυασμό με τη μειωμένη σωματική δραστηριότητα καθώς επίσης, ενδοκρινικοί, φαρμακευτικοί και γενετικοί παράγοντες ευθύνονται για την εμφάνιση της παχυσαρκίας διαταράσσοντας το ενεργειακό ισοζύγιο. Όσον αφορά τους γενετικούς παράγοντες, μεταλλάξεις και γενετικές παραλλαγές σε ένα ή περισσότερα γονίδια σχετιζόμενων με την παχυσαρκία ευθύνονται για την εκδήλωση της. Η παχυσαρκία που οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες, μπορεί να είναι Συνδρομική, Μονογονιδιακή στην οποία βασικό ρόλο διαδραματίζει το σηματοδοτικό μονοπάτι λεπτίνης-μελανοκορτίνης ή Πολυγονιδιακή όπου έχουν εντοπιστεί αρκετές γενετικές παραλλαγές που συσχετίζονται με την εμφάνιση της παχυσαρκίας. Στη παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι πολυμορφισμοί rs9939609 του γονιδίου FTO, rs7782313 του γονιδίου MC4R και rs2815752 του γονιδίου NEGR1 που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης παχυσαρκίας, καθώς επηρεάζουν τη μεταφορά του σήματος κορεσμού στον υποθάλαμο του εγκεφάλου, οδηγώντας σε αδιάκοπη και συνεχή υπερκατανάλωση τροφής. Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σε δείγμα 150 ατόμων, Ελληνικής καταγωγής και των 2 φύλων. Μελλοντικά, η γονοτύπηση των 3 υπό μελέτη πολυμορφισμών, μπορεί να αξιοποιηθεί στην ανάπτυξη εξατομικευμένης θεραπείας με στόχο το άτομο να αισθάνεται κορεσμό και να μην καταφεύγει στην κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων τροφών που θα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση βάρους και εκδήλωση παχυσαρκίας.

ABSTRACT

According to the World Health Organization (WHO) increased adiposity and obesity are defined as abnormal or excessive fat accumulation that present a risk to health, increasing the risk for type 2 diabetes mellitus, cardiovascular diseases and the appearance of many types of cancer. Increased adiposity and obesity are both the result of different factors. Specifically, fat-rich diet combined with reduced physical activity as well as endocrine, medicinal and genetic factors are responsible for the appearance of obesity by disturbing the energy balance (imbalance of caloric intake). Concerning the genetic factors, genetic variations in one or more genes are responsible for the occurrence of increased adiposity and obesity. Obesity due to genetic factors, is categorized into monogenic syndromic obesity and monogenic non-syndromic obesity in which a major role is attributed on the leptin-melanocortin signaling pathway or polygenic obesity where several genetic variants that correlate with the occurrence of obesity, have been identified. In the present study, the frequency of three genetic variations, associated with an increased risk of obesity, was investigated in a population of Greek ethnicity. Genetic variations in these genes alter the transfer of the saturation signal in the hypothalamus of the brain, leading to uninterrupted food consumption; rs9939609 of the FTO gene, rs7782313 of the MC4R gene and rs2815752 of the NEGR1 gene. Genotyping these variants can be used to detect overeating behaviour due to lack of saturation, thus prevent the consumption of large amounts of food that will result in weight gain and obesity, by drastic lifestyle changes

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization, WHO), ορίζει το υπερβολικό βάρος ή την παχυσαρκία ως την ανώμαλη ή υπερβολική συσσώρευση λίπους που παρουσιάζει κίνδυνο για την υγεία⁴². Πιο συγκεκριμένα, ένα άτομο χαρακτηρίζεται ως παχύσαρκο όταν έχει αυξημένο σωματικό βάρος σύμφωνα με το φύλο, την ηλικία και το ύψος του. Το αυξημένο βάρος περιλαμβάνει μυς, οστά, λίπος, σωματικά υγρά. Για παράδειγμα, ένας αθλητής ιδιαίτερα μυώδης μπορεί να έχει αυξημένο βάρος, αυτό όμως δεν τον καθιστά παχύσαρκο. Επομένως, ως παχύσαρκο θεωρείται το άτομο που έχει μεγάλη συσσώρευση λίπους στο σώμα.

Στο σημείο αυτό, αξίζει να επισημανθεί η διαφορά μεταξύ υπέρβαρου και παχύσαρκου. Παρ' όλο που αυτές οι δύο λέξεις χρησιμοποιούνται πολλές φορές από το ευρύ κοινό σαν να έχουν ίδια σημασία, είναι τελείως διαφορετικές ορολογίες. Ο υπέρβαρος άνθρωπος έχει παραπάνω κιλά από αυτά που μπορεί να αντέξει ο σκελετός του ενώ, ο παχύσαρκος άνθρωπος έχει πολύ παραπάνω λίπος από το επιτρεπόμενο στο σώμα του.

Τα τελευταία χρόνια εξαιτίας της δραματικής αύξησης των υπέρβαρων ανθρώπων, η παχυσαρκία έχει χαρακτηριστεί από τον WHO, ως μια από τις μεγαλύτερες επιδημίες δημόσιας υγείας του 21^{ου} αιώνα, με περίπου 2 δισεκατομμύρια ενήλικες παγκοσμίως σήμερα ταξινομημένους ως υπέρβαροι ή παχύσαρκοι¹. Ακόμη, η παγκόσμια παχυσαρκία έχει σχεδόν τριπλασιαστεί από το 1975. Το 2016, πάνω από 1,9 δισεκατομμύρια ενήλικες (39%), ήταν υπέρβαροι. Από αυτά τα 650 εκατομμύρια (13%) ήταν παχύσαρκοι⁴³.

Επιπρόσθετα, στοιχεία μελετών επισημαίνουν την αύξηση του φαινομένου της παχυσαρκίας σε Παγκόσμιο επίπεδο καθώς, καταγράφεται πως το 2008 πάνω από 200 εκατομμύρια άνδρες και σχεδόν 300 εκατομμύρια γυναίκες ήταν παχύσαρκοι, αριθμοί διπλάσιοι σύμφωνα με στοιχεία ερευνών του 1980².

Η παχυσαρκία είναι μια περίπλοκη κατάσταση με σοβαρές κοινωνικές και ψυχολογικές διαστάσεις, που πλήττει όλες τις ηλικίες και τις κοινωνικοοικονομικές ομάδες και απειλεί τόσο τις ανεπτυγμένες όσο και τις αναπτυσσόμενες χώρες. Το 1995, εκτιμάται ότι 200 εκατομμύρια παχύσαρκοι ενήλικες παγκοσμίως κατηγοριοποιούνται ως υπέρβαροι. Από το 2000, ο αριθμός των παχύσαρκων ενηλίκων έχει αυξηθεί σε πάνω από 300 εκατομμύρια. Η επιδημία της παχυσαρκίας δεν περιορίζεται ωστόσο μόνο στις βιομηχανοποιημένες κοινωνίες. Ομοίως, στις αναπτυσσόμενες χώρες, εκτιμάται ότι πάνω από 115 εκατομμύρια άνθρωποι υποφέρουν από προβλήματα που σχετίζονται με την παχυσαρκία⁴⁴.

Γενικά, ο αριθμός των παχύσαρκων ή υπέρβαρων ενηλίκων έχει αυξηθεί δραματικά τα τελευταία χρόνια. Ο ρυθμός των ενηλίκων, ηλικίας 20 έως 74 ετών, οι οποίοι ταξινομήθηκαν ως παχύσαρκοι ή οι υπέρβαροι αυξήθηκε από 44,9% το 1960-1962 σε 66,2% το 2003-2004, τόσο στον ανδρικό όσο και στον γυναικείο πληθυσμό. Το ποσοστό των ατόμων που ήταν υπέρβαροι αλλά όχι παχύσαρκοι κυμαινόταν μεταξύ 31,5% και 33,4% κατά την ίδια χρονική περίοδο. Η σημαντική μεταβολή στον επιπολασμό της παχυσαρκίας σημειώθηκε μεταξύ 1980 και 2004, διπλασιάζοντας το ποσοστό σε μόλις 25 χρόνια, από 15% το 1980 σε 32,9% το 2004. Ο αριθμός

των ατόμων που ταξινομήθηκαν ως εξαιρετικά παχύσαρκοι αυξήθηκε από 0,9% το 1960 σε 5,1% το 2004³.

Συμπερασματικά, να σημειωθεί πως ο συνολικός επιπολασμός της παχυσαρκίας αυξάνεται κατά περίπου μισή μονάδα Δείκτη Μάζας Σώματος (ΔΜΣ) ανά δεκαετία κατά τη διάρκεια των τελευταίων τριών δεκαετιών και έχει ως αποτέλεσμα πάνω από 600 εκατομμύρια ενήλικες παγκοσμίως με ΔΜΣ 30 kg /m² ή μεγαλύτερο⁴.

Όσον αφορά τον ελληνικό πληθυσμό, το υπερβολικό βάρος και η παχυσαρκία αποτελούν μεγάλο πρόβλημα υγείας, ειδικά στους μεσήλικες και τους μεγαλύτερους ενήλικες. Αναλυτικότερα, σύμφωνα με έρευνα που έγινε το 2012, οι επιπολασμοί υπέρβαρου και παχύσαρκου ήταν 53% και 20% στους άνδρες και 31% και 15% στις γυναίκες. Ο μέγιστος επιπολασμός παχυσαρκίας παρατηρήθηκε σε άνδρες ηλικίας άνω των 40 ετών και σε γυναίκες ηλικίας 50 έως 59 ετών⁵.

1.2 Δείκτης Μάζας Σώματος (ΔΜΣ) - Body Mass Index (BMI)

Ο δείκτης μάζας σώματος (ΔΜΣ) καθιερώθηκε από τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας WHO, και χρησιμοποιείται ευρέως ως ο πιο συνηθισμένος δείκτης βάρους και ύψους για την άμεση εκτίμηση του σωματικού βάρους και κατηγοριοποίηση ενός ενήλικου ατόμου (άντρα ή γυναίκα) ως φυσιολογικού βάρους, υπέρβαρου ή παχύσαρκου. Ο δείκτης μάζας σώματος, δίνεται ως το αποτέλεσμα της διαίρεσης του βάρους ενός ατόμου σε κιλά (Kg) ως προς το τετράγωνο του ύψους σε μέτρα (m)⁴⁵. Δηλαδή:

$$\Delta\text{Μ}\Sigma = \text{Β}\acute{\alpha}\rho\text{ος (kg)} / \text{Ύ}\psi\text{ος}^2(\text{m})$$

Στον πίνακα 1 που ακολουθεί φαίνεται η παγκοσμίως αποδεκτή κατηγοριοποίηση των ατόμων ανάλογα με το ΔΜΣ⁶:

Ταξινόμηση του ΔΜΣ	
Λιποβαρής	<18.5
Φυσιολογικός	18.5-24.9
Υπέρβαρος	25-29.9
Παχύσαρκος 1 ^{ος} Βαθμού	30-34.9
Παχύσαρκος 2 ^{ος} Βαθμού	35-39.9
Νοσηρή Παχυσαρκία	<40

Πίνακας 1: Ταξινόμηση Δείκτη Μάζας Σώματος (ΔΜΣ).

Σύμφωνα με τα στοιχεία του πίνακα:

- Ποσοστό λίπους μικρότερο από 18,5 δείχνει ότι το άτομο είναι **ελλιποβαρές**.
- Ποσοστό λίπους μεταξύ 18,5 και 24,9 δείχνει ότι το άτομο έχει **φυσιολογικό βάρος**.
- Ποσοστό λίπους μεταξύ 25 και 29,9 δείχνει ότι το άτομο είναι **υπέρβαρο**.
- Ποσοστό λίπους 30 και μεγαλύτερο δείχνει ότι το άτομο πάσχει από **παχυσαρκία**.

1.3 Επιπτώσεις υπερβολικού βάρους και παχυσαρκίας

Το υπερβολικό βάρος και η παχυσαρκία αποτελούν σοβαρή και αυξανόμενη απειλή για την υγεία των πληθυσμών παγκοσμίως. Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι το υπερβολικό σωματικό βάρος αυξάνει τη θνησιμότητα όλων των αιτιών, μειώνοντας το προσδόκιμο ζωής από 5 έως 10 χρόνια. Το υπερβολικό βάρος και η παχυσαρκία συνδέονται με δυσμενείς επιπτώσεις και διαταραχές για την υγεία, όπως σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, καρδιαγγειακές παθήσεις και ορισμένους τύπους καρκίνου^{1,7}.

1.3.1 Αυξημένος κίνδυνος Σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2

Στις αρχές του αιώνα εκτιμήθηκε ότι 171 εκατομμύρια άνθρωποι έχουν διαβήτη τύπου 2. Έχει αποδειχθεί πως η παχυσαρκία συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης αντοχής στην ινσουλίνη και διαβήτη τύπου 2. Στα παχύσαρκα άτομα, ο λιπώδης ιστός απελευθερώνει αυξημένες ποσότητες μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων, γλυκερόλης, ορμονών, προφλεγμονωδών κυτοκινών και άλλων παραγόντων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη αντοχής στην ινσουλίνη. Όταν η περιφερική αντίσταση στην ινσουλίνη συνοδεύεται από εξανθήση και δυσλειτουργία των β-κυττάρων του παγκρέατος (κύτταρα που απελευθερώνουν ινσουλίνη), παρατηρείται αποτυχία ελέγχου των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη διαβήτη τύπου 2.

Όποιος είναι υπέρβαρος ή/ και παχύσαρκος έχει κάποιο είδος ανθεκτικότητας στην ινσουλίνη, αλλά ο διαβήτης αναπτύσσεται μόνο σε εκείνα τα άτομα που δεν έχουν επαρκή έκκριση ινσουλίνης. Δηλαδή η ινσουλίνη σε αυτούς τους ανθρώπους μπορεί να είναι υψηλή, όμως δεν αρκεί ώστε να ομαλοποιήσει το επίπεδο της γλυκόζης στο αίμα^{8,9,10}.

1.3.2 Αυξημένος κίνδυνος Καρδιαγγειακών Παθήσεων

Οι καρδιαγγειακές παθήσεις είναι διαταραχές της καρδιάς και των αιμοφόρων αγγείων αντιπροσωπεύοντας ένα ευρύ φάσμα διαταραχών όπως είναι η στεφανιαία νόσος, η εγκεφαλική νόσος, η ρευματική καρδιακή νόσος, η συγγενής καρδιοπάθεια, η υπέρταση, η περιφερική αγγειακή νόσος, η συγκοπή και οι καρδιομυοπάθειες.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν την πρώτη αιτία θανάτου παγκοσμίως. Υπολογίζεται ότι 17,9 εκατομμύρια άνθρωποι έχασαν τη ζωή τους από καρδιαγγειακά νοσήματα το 2016, που αντιπροσωπεύουν το 31% όλων των θανάτων παγκοσμίως. Από αυτούς τους θανάτους, το 85% οφείλεται σε καρδιακή προσβολή και εγκεφαλικό επεισόδιο.

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα προκαλούνται λόγω δημιουργίας αθηρωματικής πλάκας, με αποτέλεσμα τη στένωση των αγγείων και τη μη ομαλή κυκλοφορία του αίματος. Η αιτία των καρδιαγγειακών παθήσεων, είναι συνήθως ένας συνδυασμός παραγόντων κινδύνου, όπως η **παχυσαρκία** καθώς επίσης και το κάπνισμα, η ανθυγιεινή διατροφή, η σωματική αδράνεια, το αλκοόλ^{46,47}.

1.3.3 Αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης Καρκίνου

Ο επιπολασμός της παχυσαρκίας που αυξάνεται σταθερά τις τελευταίες δεκαετίες αποτελεί καθοριστικό παράγοντα κινδύνου και για πολλούς τύπους καρκίνου, από τους οποίους σχεδόν το 13% αυτών οφείλονται στην παχυσαρκία. Τα υπέρβαρα ή παχύσαρκα άτομα, όπως ορίζονται με υψηλό Δείκτη Μάζας Σώματος ($\geq 25 \text{ kg/ m}^2$), παρουσιάζουν αυξημένο τον κίνδυνο για 11 μορφές καρκίνου, όπως του εντέρου, του παγκρέατος, των νεφρών, της μήτρας, του μαστού, των ωοθηκών, του οισοφάγου.

Πιο αναλυτικά, η παχυσαρκία σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του οισοφάγου, του μυελού των οστών, του παχέος εντέρου (στους άνδρες), των χοληφόρων οδών, του παγκρέατος, του ενδομητρίου (στις γυναίκες προ της εμμηνόπαυσης) και των νεφρών. Για κάθε πέντε μονάδες αύξησης του δείκτη μάζας σώματος ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου αυξάνεται από 9% στην περίπτωση του καρκίνου του παχέος εντέρου στους άνδρες, έως 56% στην περίπτωση του καρκίνου του χοληφόρου συστήματος. Αντίστοιχα, ο κίνδυνος καρκίνου της μήτρας αυξάνεται κατά 21% για κάθε αύξηση κατά 0,1 της αναλογίας μέσης/ γοφών στις γυναίκες⁴⁸.

1.4 Παράγοντες εμφάνισης παχυσαρκίας

Το αυξημένο βάρος ή η παχυσαρκία μπορεί να είναι αποτέλεσμα διαφόρων παραγόντων. Ειδικότερα, η πλούσια σε λιπαρά διατροφή και ο καθιστικός τρόπος ζωής με μειωμένη σωματική δραστηριότητα καθώς επίσης, ενδοκρινικοί, φαρμακευτικοί και γενετικοί παράγοντες ευθύνονται για την εμφάνιση παχυσαρκίας διαταράσσοντας το ενεργειακό ισοζύγιο.

1.4.1 Διαταραχή ενεργειακού ισοζυγίου

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), ως κύρια αιτία του υπερβολικού βάρους και της παχυσαρκίας θεωρείται, η διαταραχή της ενεργειακής ισορροπίας, όπου η ενεργειακή πρόσληψη υπερβαίνει την ενεργειακή κατανάλωση για μια σημαντική χρονική περίοδο⁴⁹.

Ως ενεργειακό ισοζύγιο ορίζεται η κατάσταση κατά την οποία ένα άτομο προσλαμβάνει από τη διατροφή τόσες θερμίδες όσες καταναλώνει ημερησίως. Στην κατάσταση του ενεργειακού ισοζυγίου, το σωματικό βάρος του ατόμου παραμένει σταθερό⁵⁰.

Επομένως, σε περίπτωση που οι θερμίδες που προσλαμβάνουμε είναι περισσότερες από αυτές που καταναλώνουμε, το ενεργειακό ισοζύγιο είναι θετικό και το σωματικό βάρος αρχίζει και αυξάνεται. Πολύ μικρές αποκλίσεις από το ενεργειακό ισοζύγιο, της τάξης του 1-2% της ημερήσιας ενεργειακής πρόσληψης, μπορούν να οδηγήσουν σε μεγάλες μακροπρόθεσμες αλλαγές στο σωματικό βάρος ($\sim 20 \text{ kg}$)¹¹. Το σωματικό βάρος που αποκτάται επηρεάζει την ενεργειακή δαπάνη. Το αυξημένο βάρος και άρα, το «μεγαλύτερο σώμα» απαιτεί περισσότερη ενέργεια προκειμένου να διατηρηθεί. Παράλληλα, το «μεγαλύτερο σώμα», ενεργειακά είναι λιγότερο αποδοτικό επειδή η κίνηση μπορεί να είναι πιο δύσκολη και άρα, χρειάζεται παραπάνω ενέργεια. Η μεγαλύτερη ενεργειακή πρόσληψη θα οδηγήσει σταδιακά σε ένα υπέρβαρο και κατά συνέπεια παχύσαρκο άτομο¹².

1.4.2 Διατροφή και καθιστικός τρόπος ζωής

Διαιτητικά πρότυπα που γενικά χαρακτηρίζονται από υψηλότερες προσλήψεις επεξεργασμένου αμύλου, κόκκινου κρέατος, κορεσμένων λιπαρών και ζαχαρούχων γλυκαντικών τροφίμων και ποτών, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη παχυσαρκίας.

Η «κακές» διατροφικές συνήθειες σε συνδυασμό με την μειωμένη σωματική δραστηριότητα μπορεί να έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία των ανθρώπων και στην ισορροπία του ενεργειακού ισοζυγίου. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) περίπου 2 εκατομμύρια θάνατοι ετησίως οφείλονται στο καθιστικό τρόπο ζωής, ο οποίος θα μπορούσε να είναι μεταξύ των 10 κύριων αιτιών θανάτου παγκοσμίως⁵¹.

Ο καθιστικός τρόπος ζωής ορίζεται ως ένας τρόπος ζωής, κατά τον οποίο το άτομο δεν πραγματοποιεί την απαιτούμενη σωματική δραστηριότητα γεγονός που οφείλεται στον τρόπο ζωής της σημερινής εποχής και πιο συγκεκριμένα, στις σύγχρονες εργασιακές συνθήκες, στη τηλεόραση, στη τεχνολογία με τους ηλεκτρονικούς υπολογιστές και το διαδίκτυο που μας έχουν εγκλωβίσει σε μία καρέκλα επιβάλλοντας έναν καθιστικό τρόπο ζωής. Αυτή η σύγχρονη καθημερινότητα σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα φυσικής δραστηριότητας με αποτέλεσμα ένα υπέρβαρο ή παχύσαρκο άτομο.

1.4.3 Ενδοκρινικά αίτια

Έχει αποδειχθεί ότι ο υποθυροειδισμός συμβάλλει σημαντικά στην αύξηση βάρους. Αναλυτικότερα, υπάρχει μια στενή συσχέτιση μεταξύ του σωματικού βάρους και των θυροειδών ορμονών. Ο θυροειδής αδένας προάγει την έκκριση ορμονών που ελέγχουν τον τρόπο με τον οποίο το σώμα μετατρέπει τις θερμίδες σε ενέργεια. Αναλυτικότερα, οι θυροειδικές ορμόνες ρυθμίζουν το βασικό μεταβολισμό, τη θερμογένεση και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των λιπιδίων και της γλυκόζης.

Η δυσλειτουργία του θυροειδούς συσχετίζεται με μεταβολές στο σωματικό βάρος. Όταν ο θυροειδής υπολειτουργεί, το άτομο πάσχει από υποθυροειδισμό και το σώμα δεν καίει τόσες θερμίδες όσες θα έκαίγε υπό κανονικές συνθήκες, με αποτέλεσμα να αποθηκεύει λίπος. Στην περίπτωση υποθυροειδισμού, ο θυροειδής αδένας απελευθερώνει πολύ λίγες θυροειδικές ορμόνες στο ορό του αίματος. Η μικρή ποσότητα ορμονών τείνει να επιβραδύνει τις λειτουργίες του οργανισμού, και συνδέεται με μειωμένη θερμογένεση, μειωμένο μεταβολικό ρυθμό και έχει επίσης αποδειχθεί ότι συσχετίζεται με υψηλότερο δείκτη μάζας σώματος και υψηλότερο επιπολασμό της παχυσαρκίας^{13,14}.

1.4.4 Φαρμακευτικά αίτια

Τα περισσότερα φάρμακα βελτιώνουν την υγεία και την ποιότητα της ζωής των ανθρώπων που αντιμετωπίζουν πρόβλημα υγείας. Ωστόσο, πολλές φορές, ένας μεγάλος αριθμός φαρμάκων,

αντιφλεγμονώδη, αντικαταθλιπτικά, αντισυλληπτικά, φάρμακα θεραπείας του διαβήτη, εμφανίζουν ανεπιθύμητες παρενέργειες όπως είναι η αύξηση του σωματικού βάρους.

Για παράδειγμα τα κορτικοειδή φάρμακα, όπως η κορτιζόνη και η πρεδνιζόνη, έχουν αντιφλεγμονώδη δράση και χορηγούνται για την θεραπεία μεγάλου αριθμού καταστάσεων, όπως, βρογχικό άσθμα, αλλεργική ρινίτιδα, κνίδωση, έκζεμα, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (COPD), φλεγμονώδεις καταστάσεις του δέρματος, ρευματοειδή αρθρίτιδα. Ωστόσο, η χορήγηση κορτικοειδών φαρμάκων συνοδεύεται από πλήθος παρενεργειών, μεταξύ άλλων την **αυξημένη όρεξη και η πιθανή αύξηση βάρους** καθώς επίσης ακμή, αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης λοιμώξεων, μεταβολές της διάθεσης και κατάθλιψη, διαβήτη, υψηλή πίεση αίματος, οστεοπόρωση^{52,53}.

1.4.5 Γενετική της Παχυσαρκίας

Η αύξηση βάρους και η παχυσαρκία μπορεί να είναι αποτέλεσμα γενετικών παραγόντων. Συγκεκριμένα, μεταλλάξεις ενός ή περισσότερων γονιδίων σχετιζόμενων με την παχυσαρκία, οδηγούν στην εμφάνισή της. Η παχυσαρκία μπορεί να είναι Συνδρομική, Μονογονιδιακή ή Πολυγονιδιακή.

1.4.5.1 Συνδρομική Παχυσαρκία

Έχει βρεθεί, πως περίπου 20 με 30 σύνδρομα όπως, τα σύνδρομα Prader-Willi, Bardet-Biedl, Alstrom syndrome, Albright's hereditary osteodystrophy (pseudohypoparathyroidism), Carpenter, MOMO, Rubinstein-Taybi, fragile X και το σύνδρομο Börjeson-Forsman-Lehman επηρεάζουν το σωματικό βάρος οδηγώντας στην εμφάνιση παχυσαρκίας. Η συνδρομική παχυσαρκία οφείλεται σε γενετικές, χρωμοσωμικές ανωμαλίες ορισμένων γονιδίων. Μεταξύ όλων, το σύνδρομο Prader-Willi (PWS) είναι το συνηθέστερο σύνδρομο στους ανθρώπους που σχετίζεται με την παχυσαρκία, με χαμηλότερη εκτιμώμενη συχνότητα 1 στις 25.000 γεννήσεις¹⁵. Το σύνδρομο Prader-Willi (PWS) οφείλεται σε γενετική διαταραχή λόγω της απώλειας λειτουργίας συγκεκριμένων γονιδίων. Αναλυτικότερα, πρόκειται για μια φυλοσυσχετιζόμενη διαταραχή, κατά την οποία το σύνδρομο εμφανίζεται είτε λόγω απώλειας της περιοχής 15q11.2-q13 από τον πατέρα (65- 75% των περιπτώσεων), είτε επειδή το άτομο που εμφανίζει το συγκεκριμένο σύνδρομο έχει δύο αντίγραφα του χρωμοσώματος 15 από την μητέρα του και κανένα αντίγραφο από τον πατέρα του. Το σύνδρομο Prader-Willi χαρακτηρίζεται από σοβαρή υποτονία με αναπνευστικές, τροφικές και αναπτυξιακές δυσκολίες κατά την βρεφική ηλικία, ακολουθούμενη από υπερβολική κατανάλωση τροφής και σταδιακή ανάπτυξη παχυσαρκίας σε νεαρή ηλικία. Επίσης, όλα τα άτομα που πάσχουν από το σύνδρομο αυτό παρουσιάζουν διανοητική αναπηρία. Τόσο τα αρσενικά όσο και τα θυληκά άτομα,



Εικόνα 1³⁴: Σύνδρομο Prader-Willi (PWS).

χαρακτηρίζονται από υπογοναδισμό, υποπλασία γεννητικών οργάνων, ελλιπή εφηβική ανάπτυξη, και στην πλειοψηφία τους είναι στείρα. Τέλος, η αυταρχική συμπεριφορά, οι διαταραχές στον ύπνο, η σκολίωση και το κοντό ανάστημα, το οποίο οφείλεται στην ανεπάρκεια αυξητικής ορμόνης είναι κοινά χαρακτηριστικά για τα άτομα που πάσχουν από το σύνδρομο Prader-Willi¹⁶.

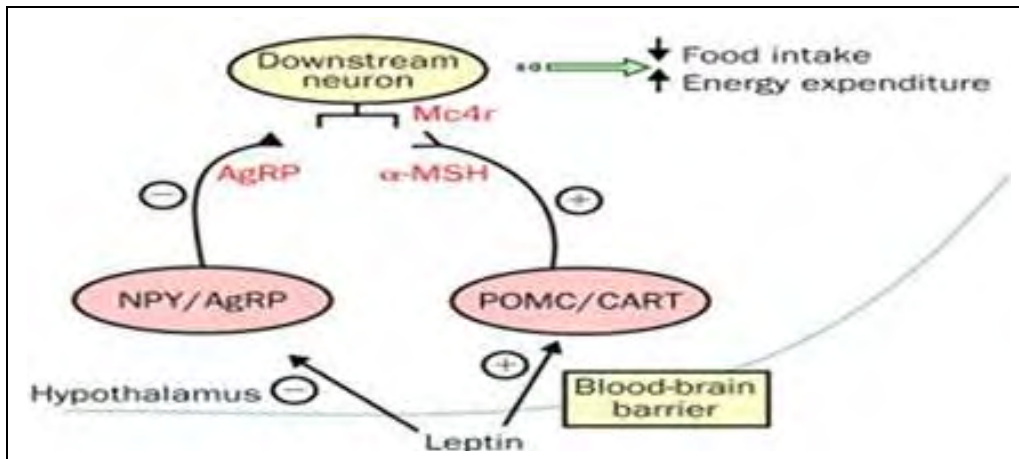
1.4.5.2 Μονογονιδιακή Παχυσαρκία

Ορισμένες μορφές μονογονιδιακής παχυσαρκίας αφορούν μεταλλάξεις γονιδίων σχετιζόμενων με την όρεξη. Οι περιπτώσεις μονογονιδιακής παχυσαρκίας επηρεάζουν το σωματικό βάρος οδηγώντας στην εμφάνιση παχυσαρκίας και ορισμένες από αυτές τις περιπτώσεις οφείλονται σε μεταλλάξεις γονιδίων σχετιζόμενων με την όρεξη που εμπλέκονται στο σηματοδοτικό μονοπάτι λεπτίνης-μελανοκορτίνης στον υποθάλαμο, βασικού ρυθμιστή της όρεξης, της πρόσληψης τροφής και κατανάλωσης ενέργειας¹.

Έχει αποδειχθεί πως το σύστημα λεπτίνης-μελανοκορτίνης έχει καθοριστικό ρόλο στη διατροφική συμπεριφορά και την ομοιόσταση της ενέργειας. Αναλυτικότερα, ο τοξοειδής πυρήνας, που βρίσκεται στη βάση του υποθαλάμου περιέχει πλούσιο δίκτυο νευρώνων, που συνθέτουν ορεξιογόνα πεπτίδια, όπως το νευροπεπτίδιο Υ (NPY), τα οπιοειδή, τη β-ενδορφίνη, εγκεφαλίνες και γαλανίνη. Επίσης, περιέχει δίκτυο νευρώνων, που συνθέτουν ανορεξιογόνα πεπτίδια, όπως η υποομάδα α της μελανοκορτίνης (α-MSH), το πεπτίδιο «agouti related protein (AGRP)» και το νευροπεπτίδιο cocaine and amphetamine related transcript (CART). Τα ορεξιογόνα προωθούν την πρόσληψη τροφής και μειώνουν την κατανάλωση ενέργειας ενώ, τα ανορεξιογόνα πεπτίδια έχουν την αντίθετη επίδραση αυξάνοντας την όρεξη.

Η λεπτίνη συνδέεται στον υποδοχέα της και οι νευρώνες που εκφράζουν προ-όπιομελανοκορτίνη (POMC), αναστέλλουν την σύνθεση AGRP, ενώ η POMC τροποποιείται μετα-μεταγραφικά για να παράγουν πεπτίδια α, β, γ-μελανοκορτίνης (α, β, γ- MSH). Ο ρόλος του NPY και του AGRP είναι να αναστείλλουν τους υποδοχείς μελανοκορτίνης 3 και 4. Το AGRP και α- MSH συναγωνίζονται για θέση πρόσδεσης στον υποδοχέα μελανοκορτίνης 4, το AGRP καταστέλλοντας τη λειτουργία του και το α-MSH ενεργοποιώντας το σηματοδοτικό μονοπάτι. Το σήμα είναι ορεξιγενές όταν το σηματοδοτικό μονοπάτι καταστέλλεται και ανορεξιγενές όταν το σηματοδοτικό μονοπάτι ενεργοποιείται^{17,18} (Εικόνα 2).

Μεταλλάξεις σε οποιοδήποτε από τα προαναφερόμενα γονίδια έχεις ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μονογονιδιακής παχυσαρκίας.



Εικόνα 2⁵⁵: Σηματοδοτικό μονοπάτι λεπτίνης μελανοκορτίνης. **POMC**: προ-όπιομελανοκορτίνη, **CART**: νευροπεπτίδιο cocaine and amphetamine related transcript, **NPY**: νευροπεπτίδιο Y, **AgRP**: πεπτίδιο agouti related protein, **α-MSH**: υποομάδα α της μελανοκορτίνης, **MC4R**: υποδοχέας μελανοκορτίνης 4.

1.4.5.3 Πολυγονιδιακή Παχυσαρκία

Μελέτες συσχέτισης γονιδιώματος (GWAS) χρησιμοποιώντας πολυμορφισμούς ενός νουκλεοτιδίου (SNPs) έχουν εντοπίσει πάνω από 40 γενετικές παραλλαγές μέχρι σήμερα που σχετίζονται με κίνδυνο για παχυσαρκία και υψηλό Δείκτη Μάζας Σώματος ($\Delta\text{M}\Sigma > 30 \text{ kg / m}^2$)². Η σοβαρή παχυσαρκία που αποδίδεται σε μετάλλαξη ενός νουκλεοτιδίου εκτιμάται ότι αντιπροσωπεύει μόνο το 5-10% των περιπτώσεων. Παρ' όλα αυτά, οι γενετικές μελέτες έχουν δώσει σημαντική εικόνα για την παθοφυσιολογία της παχυσαρκίας και έχουν υπογραμμίσει τον κεντρικό ρόλο του υποθαλάμου ως βασικό ρυθμιστή της όρεξης. Ορισμένες τέτοιες γενετικές παραλλαγές που εμπλέκονται με αυξημένο δείκτη μάζας σώματος είναι ο πολυμορφισμός rs9939609 του γονιδίου FTO, ο πολυμορφισμός rs7782313 του γονιδίου MC4R και ο πολυμορφισμός rs2815752 του γονιδίου NEGR1.

1.4.5.3.1 FTO

Πριν από το 2007, παρά τις τεράστιες προσπάθειες που έγιναν με μελέτες σύνδεσης γονιδιώματος για ταυτοποίηση υποψήφιων γονιδίων για παχυσαρκία και υψηλό Δείκτη Μάζας Σώματος (BMI), καμία γενετική παραλλαγή δεν είχε αναμφισβήτητα συνδεθεί με τον κίνδυνο για παχυσαρκία και αυξημένο BMI¹⁹.

Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, οι μελέτες γονιδιακής σύνδεσης (GWAS), οι οποίες ελέγχουν τη συσχέτιση μεταξύ των SNPs σε ολόκληρο το γονιδίωμα κατάφεραν να αναγνωρίσουν παραλλαγές που σχετίζονται με παχυσαρκία. Συγκεκριμένα, το 2007, χρησιμοποιώντας το GWAS, μια Βρετανική ερευνητική ομάδα με επικεφαλής τον Dr. Andrew Hattersley της Ιατρικής Σχολής της Peninsula στο Exeter ανακάλυψε μια παραλλαγή γονιδίου που έδειξε ισχυρή σχέση με τον δείκτη μάζας σώματος (BMI). Το γονίδιο που φιλοξενεί την παραλλαγή ονομάζεται FTO (Fat mass and obesity-associated protein). Περαιτέρω μελέτες μεταξύ 38.759 Βρετανών, Φινλανδών και Ιταλών έδειξαν επίσης παρόμοια σύνδεση μεταξύ των παραλλαγών FTO και του σωματικού βάρους. Ακολούθως, πολλές γενετικές παραλλαγές του FTO όπως rs9939609,

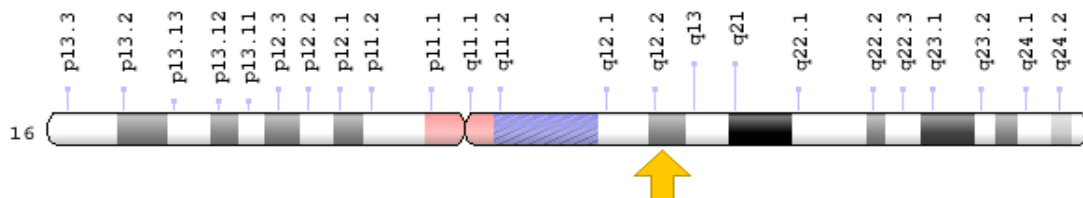
rs9930506, rs1421085, rs17817449 και rs1121980 έχουν επίσης αποδειχθεί ότι προσδίδουν πολύ σημαντικό κίνδυνο για εκδήλωση παχυσαρκίας. Ακόμη, μια μελέτη σε Σινγκαπούρους Κινέζους, Μαλαιούς και Ασιάτες-Ινδούς επιβεβαίωσε επίσης την επίδραση των γενετικών παραλλαγών FTO και του κινδύνου παχυσαρκίας²⁰.

Το FTO είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη της οικογένειας διοξυγενάσης που εξαρτάται από AIkB που δεν σχετίζεται με το σίδηρο και 2-οξυγλουταρικό άλας και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος. Το FTO ποντικού και ανθρώπου έχει αποδειχθεί ότι απομεθυλώνει υπολείμματα 3-μεθυλθυμίνης και 3-μεθυλουρακίλης σε μονόκλωνο DNA και RNA in vitro²¹.

Το FTO αναγνωρίστηκε αρχικά σε ποντίκια ως ένα από τα γονίδια που κωδικοποιήθηκαν λόγω διαγραφής 1,6 Mb προκαλώντας τη μετάλλαξη συντηγμένων δακτύλων. Έπειτα, παγματοποιήθηκε ισχυρή συσχέτιση μιας σειράς πολυμορφισμών νουκλεοτιδίων (SNPs) του γονιδίου FTO, και ιδιαίτερα του πολυμορφισμού rs9939609, σε άτομα με διαβήτη τύπου 2²¹.

Στους ανθρώπους, το FTO εκφράζεται στον πυρήνα των κυττάρων κάθε ιστού. Το γονίδιο εκφράζεται σε υψηλό βαθμό στον υποθάλαμο και τους τοξοειδείς, παρακοιλιακούς, αμφιβληστροειδικούς και κοιλιακούς πυρήνες που ελέγχουν την ενεργειακή ομοιόσταση και τη διατροφική συμπεριφορά²². Ερευνώντας την έκφραση του FTO σε ανθρώπινα έμβρυα και σε ενήλικους ιστούς μέσω RT-PCR εντοπίστηκε μια πανταχού παρούσα έκφραση σε όλους τους ιστούς εμβρύων και ενηλίκων που εξετάστηκαν, με υψηλότερη έκφραση FTO στο κεντρικό νευρικό σύστημα και στο ήπαρ²¹.

Το σύνολο των πολυμορφισμών (SNPs) του γονιδίου FTO, που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για σοβαρή παχυσαρκία εντοπίζονται στο πρώτο ινρόνιο του χρωμοσώματος 16 και πιο συγκεκριμένα, στην περιοχή 16q12.2, η οποία περιέχει 9 εξόνια στον άνθρωπο και περιλαμβάνει 410,507 bp²³ (Εικόνα 3).



Εικόνα 3⁵⁶: Τοποθεσία περιοχής 16q12.2 στο ανθρώπινο γονιδίωμα.

1.4.5.3.1.2 FTO - rs9939609

Ο πολυμορφισμός rs9939609 είναι το πιο ισχυρά, SNP της 1^{ης} ιντρονικής περιοχής του γονιδίου FTO, συνδεδεμένο με την εκδήλωση παχυσαρκίας και υψηλό BMI²³. Πρόκειται για αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου της Θυμίνης (T) σε Αδενίνη (A). Το αλληλόμορφο (A) του πολυμορφισμού rs9939609 συσχετίστηκε με αυξημένο BMI²⁴. Οι ομόζυγοι για το αλληλόμορφο κινδύνου (A/A) παρουσιάζουν 1,6 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για εμφάνιση παχυσαρκίας. Μελέτη που διεξήχθη σε Πολωνικό πληθυσμό επίσης αποδεικνύει ότι ο γονότυπος A/A του rs9939609 συσχετίστηκε με υψηλότερο BMI²². Επίσης, οι ετερόζυγοι (T/A) παρουσιάζουν 1,3 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο και οι ομόζυγοι για το προστατευτικό αλληλόμορφο (T/T), χαρακτηρίζονται από χαμηλό κίνδυνο για παχυσαρκία⁵⁷. Τα άτομα που είναι ομόζυγα για το

αλληλόμορφο κινδύνου (A) ζυγίζει κατά μέσο όρο, 3 kg περισσότερο από αυτά που είναι ομόζυγα για το προστατευτικό αλληλόμορφο (T)¹⁹. Επομένως, το αλληλόμορφο κινδύνου συνδέεται με μεγαλύτερη πρόσληψη τροφής, αυξημένη πείνα και μειωμένη αίσθηση κορεσμού.

1.4.5.3.2 MC4R

Οι μελανοκορτίνες εκφράζονται στον υποθάλαμο και παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της όρεξης. Η διέγερση της εγκεφαλικής μελανοκορτίνης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της πρόσληψης τροφής και του βάρους. Μεταλλάξεις του γονιδίου του υποδοχέα της μελανοκορτίνης 4 (MC4R, πρωτεΐνη που στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο MC4R) έχουν εμπλακεί σε ζωικά μοντέλα και μελέτες σε ανθρώπους για αύξηση του σωματικού βάρους. Συγκεκριμένα, μελέτες σε ζώα έδειξαν ότι η ανεπάρκεια MC4R μπορεί να είναι υπεύθυνη για διάφορες μεταβολικές και σχετιζόμενες με την κατανάλωση αλλαγές, όπως αυξημένη όρεξη και υπερφαγία με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά²⁵.

Το γονίδιο MC4R εκτός από τις περιπτώσεις μονογονιδιακής παχυσαρκίας (βλέπε παράγραφο 1.4.5.2) εμπλέκεται και στην πολυπαραγοντική παχυσαρκία. Ειδικότερα, μελέτες συσχέτισης σε επίπεδο γονιδιώματος (GWAS) υποδηλώνουν ότι αρκετοί δείκτες κοντά στο MC4R (π.χ. rs17782313, rs571312) σχετίζονται έντονα με την παχυσαρκία²⁵. Στους ανθρώπους οι μεταλλάξεις στο γονίδιο MC4R, είναι υπεύθυνη για το 0,5-6% των ασθενών με νοσηρή παχυσαρκία¹⁸. Η κατανομή των υποδοχέων MC4R στον ανθρώπινο εγκέφαλο δεν είναι γνωστή μέχρι σήμερα. Αντιθέτως, σε εγκεφάλους τρωκτικών, η έκφραση MC4R έχει επιβεβαιωθεί σε αμυγδαλή, υπόκαμπο, υποθάλαμο, τροχιακό φλοιό, οσφρητικό φλοιό, ραβδωτό σώμα και εγκεφαλικό στέλεχος, με ορισμένες διαφορές μεταξύ των δύο φύλων²⁶.

Οι πολυμορφισμοί του MC4R γονιδίου εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 18 και συγκεκριμένα στην περιοχή 18q21.32 (Εικόνα 4).



Εικόνα 4⁵⁸: Τοποθεσία περιοχής 18q21.32 στο ανθρώπινο γονιδίωμα.

1.4.5.3.2.2 MC4R - rs7782313

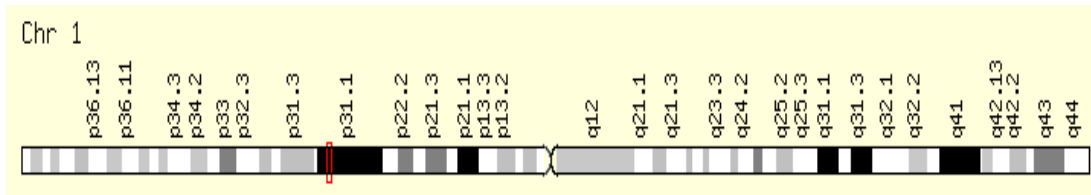
Ο πολυμορφισμός rs17782313 του γονιδίου MC4R, έχει μελετηθεί εκτεταμένα και έχει επανειλημμένα επιβεβαιωθεί η συσχέτιση του με αυξημένο BMI και παχυσαρκία. Πρόκειται για αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου της Θυμίνης (T) σε Ουρακίλη (C). Το αλληλόμορφο (C) του πολυμορφισμού rs17782313 συσχετίστηκε με αυξημένο BMI²⁵. Οι ομόζυγοι για το αλληλόμορφο κινδύνου (C/C) εμφανίζουν υψηλότερο BMI κατά 0,44 μονάδες, οι ετερόζυγοι (T/C) εμφανίζουν υψηλότερο BMI κατά 0,22 μονάδες και οι ομόζυγοι για το προστατευτικό αλληλόμορφο εμφανίζουν φυσιολογικό BMI⁵⁹.

1.4.5.3.3 NEGR1

Μελέτες συσχέτισης σε επίπεδο γονιδιώματος (GWAS) σε ενήλικες έδειξαν ότι το NEGR1 σχετίζεται με τη ρύθμιση του BMI λόγω διαγραφής δύο αλληλομόρφων 43 και 8 kb. Και οι δύο διαγραφές αφαιρούν τα συντηρημένα, μη κωδικοποιητικά στοιχεία πριν από το NEGR1²⁷. Ο ρυθμιστής ανάπτυξης νευρώνων 1 (NEGR1) είναι από τις πιο πρόσφατες πρωτεΐνες που σχετίζεται με την παχυσαρκία²⁸. Η πρωτεΐνη NEGR1 ή αλλιώς νευροτρακτίνη, κωδικοποιείται από το γονίδιο NEGR1 και είναι μέλος των IgLON πρωτεϊνών. Η νευροτρακτίνη είναι ένα μόριο κυτταρικής προσκόλλησης έχοντας βασικό ρόλο στη νευρική ανάπτυξη²⁷.

Έχει αποδειχθεί ότι το NEGR1 εκφράζεται έντονα στον τοξοειδή πυρήνα (ARC) και στον κοιλιακό υποθάλαμο (VMH). Ποντίκια με μειωμένη έκφραση NEGR1 στις περιφερικές υποθαλαμικές περιοχές, παρουσιάζουν μειωμένο σωματικό βάρος και μεταβάλλουν τη ρύθμιση του ενεργειακού ισοζυγίου, υποδηλώνοντας ότι η έκφραση του NEGR1 ρυθμίζει το ενεργειακό ισοζύγιο. Επομένως, φαίνεται πως η φυσιολογική ρύθμιση της έκφρασης του NEGR1 απαιτείται για να διατηρηθεί η ενεργειακή ισορροπία μετά από έκθεση σε διατροφικές παρεμβάσεις²⁷.

Οι πολυμορφισμοί του NEGR1 που εμπλέκονται με BMI και παχυσαρκία εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 1, το μεγαλύτερο χρωμόσωμα του ανθρώπινου γονιδιώματος και συγκεκριμένα στην περιοχή 1p31.1²⁹ (Εικόνα 5).



Εικόνα 5²⁹: Τοποθεσία περιοχής 1p31.1 στο ανθρώπινο γονιδίωμα.

1.4.5.3.3 NEGR1 - rs2815752

Ο πολυμορφισμός rs2815752 του γονιδίου NEGR1 έχει άμεσα συσχετιστεί με κίνδυνο για παχυσαρκία και υψηλό BMI. Πρόκειται για αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου της Γουανίνης (G) σε Αδενίνη (A). Το αλληλόμορφο (A) του πολυμορφισμού rs2815752 συσχετίστηκε με αυξημένο BMI³⁰. Άρα, τα άτομα που είναι ομόζυγα (A/A) ή ετερόζυγα (G/A) για το αλληλόμορφο κινδύνου παρουσιάζουν μεγαλύτερο κίνδυνο για ανάπτυξη παχυσαρκίας σε σχέση με τα ομόζυγα για το προστατευτικό αλληλόμορφο (G/G).

ΣΚΟΠΟΣ

Η παχυσαρκία αποτελεί οικουμενικό πρόβλημα υγείας και έχει χαρακτηριστεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), ως μια από τις μεγαλύτερες επιδημίες δημόσιας υγείας του 21^{ου} αιώνα.

Σκοπό της παρούσας μελέτης, διαδραμάτισε η διερεύνηση του γενετικού υπόβαθρου της παχυσαρκίας στα πλαίσια του Ελλαδικού χώρου, μελετώντας 3 πολυμορφισμούς που έχει αποδειχθεί πως σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης παχυσαρκίας, σε δείγμα 150 ατόμων Ελληνικού, γενικού πληθυσμού.

Ο πρώτος πολυμορφισμός rs9939609 που εντοπίζεται στο 1^ο ιντρόνιο του γονιδίου FTO, αποτελεί το πρώτο γονίδιο που αναμφισβήτητα έχει συσχετιστεί με εκδήλωση παχυσαρκίας, ο πολυμορφισμός rs7782313 του γονιδίου του 4^{ου} υποδοχέα της μελανοκορορτίνης (MC4R), το δεύτερο σημαντικότερο γονίδιο για εμφάνιση παχυσαρκίας και ο πολυμορφισμός rs2815752 του γονιδίου NEGR1, ρυθμιστής ανάπτυξης νευρώνων 1, μια από τις πιο πρόσφατες πρωτεΐνες που σχετίζεται με την παχυσαρκία.

Οι 3 προαναφερόμενοι πολυμορφισμοί σχετίζονται με την παχυσαρκία και αυξημένο Δείκτη Μάζας Σώματος καθώς επηρεάζουν τη μεταφορά του σήματος κορεσμού στον υποθάλαμο του εγκεφάλου οδηγώντας σε κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων τροφών ή στη συνεχή και αδιάκοπη κατανάλωση τροφών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δειγματοληψία: Λαμβάνονται κύτταρα στοματικής κοιλότητας (επίχρισμα παρειάς)

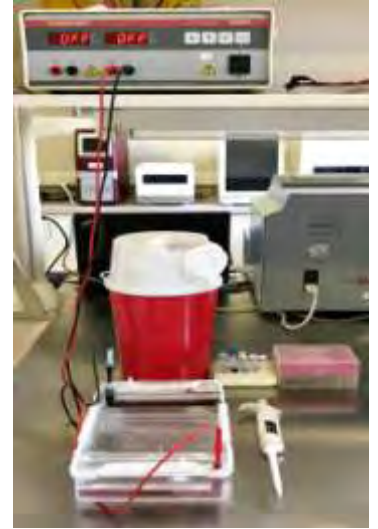
2.2 Απομόνωση DNA με τη χρήση ρομποτικού συστήματος



2.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης



2.4 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης



2.5 Γονοτύπηση Πολυμορφισμών

2.5.2 Αντίδραση SnapShot

2.5.3 Απομάκρυνση των ελεύθερων διδεόξυνουκλεοτιδίων, με αλκαλική φωσφατάση

2.5.1 Καθαρισμός προϊόντων PCR

2.5.4 Ηλεκτροφόρηση σε γενετικό αναλυτή και ανάλυση αποτελεσμάτων



2.1 Δειγματοληψία

Η παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε σε 150 άτομα και των δύο φύλλων, με 82 γυναίκες και 68 άνδρες, γενικού Ελληνικού πληθυσμού. Για την γονοτύπηση των τριών προς μελέτη πολυμορφισμών, ως «πηγή» DNA χρησιμοποιήθηκε από κάθε άτομο, κύτταρα στοματικής κοιλότητας (επίχρισμα παρειάς), τα οποία συλλέχθηκαν με τη βοήθεια στυλεού.

2.2 Απομόνωση DNA

2.2.1 Αρχή της μεθόδου

Το DNA, είναι το σημαντικότερο «εργαλείο» για την πλειοψηφία των πειραμάτων της Μοριακής Βιολογίας. Επομένως, η απομόνωση του σε «καθαρή» μορφή επιτρέπει την περαιτέρω επεξεργασία του. Η μέθοδος απομόνωσης DNA ακολουθεί τα παρακάτω στάδια:

1. Λύση των κυτταρικών μεμβρανών και της μεμβράνης του πυρήνα για να ελευθερωθεί το DNA στο διάλυμα.
2. Αποικοδόμηση κυτταρικών πρωτεϊνών με επίδραση πρωτεολυτικών ενζύμων.
3. Διαχωρισμός του DNA από τις πρωτεΐνες.
4. Καθαρισμός του DNA από υπολείμματα αλάτων με διάλυμα απόλυτης αιθανόλης.
5. Έκλουση του DNA³¹.

2.2.2 Πρωτόκολλο Απομόνωσης DNA από κύτταρα στοματικού επιχρίσματος (Buccal Swab) στο ρομποτικό σύστημα QIAcube, της QIAGEN

Η απομόνωση DNA από κύτταρα στοματικού επιχρίσματος έγινε με τη χρήση ρομποτικού συστήματος QIACUBE χρησιμοποιώντας το QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen). Στο kit περιλαμβάνονται το διάλυμα της λύσης των κυτταρικών μεμβρανών (AL Buffer), το ενζυμικό διάλυμα πρωτεάσης (Qiagen Protease), τα διαλύματα πλύσης AW1 και AW2 καθώς και όλα τα απαραίτητα αναλώσιμα πλαστικά. Για την ενυδάτωση και ανάκτηση του DNA χρησιμοποιήθηκε Nuclease-Free Water (QIAGEN).

ΕΞΟΠΟΛΙΣΜΟΣ	ΠΛΑΣΤΙΚΑ	ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ
QIAcube	Σωληνάρια τύπου eppendorf (1,5mL)	Πρωτεάση της QIAGEN, (2-8°C)
Πιπέττα 0,5-10μl	Tips με φίλτρο των 10μl, 100μl, 200μl	Ρυθμιστικό διάλυμα AL (θερμοκρασία δωματίου)
Πιπέττα 5-40μl	QIAamp Mini στήλες σε Rotor Adaptors	Απόλυτη αιθανόλη (θερμοκρασία δωματίου)
Πιπέττα 40-200μl	Μικροσωληνάρια (2mL)	Ρυθμιστικό διάλυμα AW1 (θερμοκρασία δωματίου)
	Tips με φίλτρο των 1000μl (QIAGEN)	Ρυθμιστικό διάλυμα AW2 (θερμοκρασία δωματίου)
		Καθαρό νερό (θερμοκρασία δωματίου)

Πίνακας 2: Υλικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του DNA.

Για την απομόνωση DNA από κύτταρα στοματικού επιχρίσματος, κάποια βήματα έγιναν με το χέρι και τα υπόλοιπα υλοποιήθηκαν από το ρομποτικό σύστημα όπως περιγράφεται παρακάτω:

Προετοιμασία απομόνωσης:

1. Όλα τα βήματα διεξάγονται σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Πραγματοποιείται ανακίνηση των universal που έχουν το δείγμα.
3. Το δείγμα μοιράζεται σε 3-4 μικρότερα σωληνάρια erpendorfs 1,5 ml. Κάθε erpendorf φυγοκεντρείται στα 14.000 rpm για 10 min. Με την φυγοκέντρηση καθιζάνουν τα κύτταρα και σχηματίζεται ίζημα. Σύμφωνα με τον όγκο του κυτταρικού ιζήματος υπολογίζεται η ποσότητα νερού που θα χρειαστεί να προστεθεί στο στάδιο ανάκτησης του DNA.
4. Με την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης, απορρίπτεται το υπερκείμενο.
5. Προστίθενται 200μl NaCl 5%, αναδεύουμε για να επαναιωρηθούν τα κύτταρα και μεταφέρουμε το διάλυμα αυτό στον επόμενο σωλήνα. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να συλλεχθεί όλο το κυτταρικό εναιώρημα του δείγματος, ομογενοποιημένο και και από τα 3-4 erpendorfs σε 1. Ταυτόχρονα, προετοιμάζεται ο rotor adaptor όπου θα γίνει ο καθαρισμός του DNA και ένας σωλήνας συλλέκτης όπου θα ανακτηθεί το καθαρισμένο DNA (τα στοιχεία του κάθε δείγματος καταγράφονται και στον rotor adaptor και στον σωλήνα ανάκτησης). Επειδή το στάδιο της ανάκτησης πραγματοποιείται αυτόματα από το QIACUBE, πάντα ρυθμίζεται στο στάδιο της ανάκτησης, να προστεθεί η ελάχιστη υπολογιζόμενη ποσότητα νερού, από όλα τα δείγματα. Στη συνέχεια, συμπληρώνεται η διαφορά στον όγκο, όπου χρειάζεται από τον ίδιο τον χειριστή.

Προετοιμασία και φόρτωση των δειγμάτων στο QIACube:

6. Το μηχάνημα τίθεται σε λειτουργία.
7. Ελέγχεται αν είναι επαρκής η ποσότητα των αντιδραστηρίων και αν υπάρχει ο απαραίτητος αριθμός tips.
8. Τοποθετούνται οι rotor adaptors στη φυγόκεντρο και τα κυτταρικά εναιωρήματα με την πρωτεύση στη θέση του shaker.

Αφού ολοκληρωθεί η προετοιμασία του ρομποτικού συστήματος:

9. Κλείνουμε την πόρτα του QIACUBE.
10. Από την οθόνη επιλέγουμε τις κατάλληλες ρυθμίσεις για την έναρξη απομόνωσης DNA από κύτταρα στοματικού επιχρίσματος.
11. Αφού ολοκληρωθεί το πρόγραμμα απομόνωσης απορρίπτεται ο rotor adaptor και φυλάσσεται ο σωλήνας συλλέκτης, που έχει ενσωματωμένο το φίλτρο.
12. Προστίθεται η υπόλοιπη ποσότητα νερού, σε όποιο δείγμα χρειάζεται και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 9.800rpm/ 1min.

Το απομονωμένο DNA φυλάσσεται στους 2-8°C έτοιμο για περαιτέρω επεξεργασία.

2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

2.3.1 Αρχή της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια τεχνική που έχει ως σκοπό τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων τμημάτων DNA in vitro έως και ένα τρισεκατομμύριο φορές, γεγονός που είναι απαραίτητο για μετέπειτα χειρισμούς (π.χ. ηλεκτροφόρηση, αλληλούχιση).

Τα βασικά συστατικά μιας PCR αντίδρασης είναι:

1. DNA πολυμεράση: Ταq DNA polymerase που απομονώνεται από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και έχει ως στόχο την αντιγραφή του DNA.
2. Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές (primers): ολιγονουκλεοτίδια συνήθως 18-30bp που οριοθετούν το τμήμα DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Οι εκκινητές πρέπει να έχουν απόλυτη συμπληρωματικότητα προς την αλληλουχία στόχο, αλλά ελάχιστη έως καθόλου συμπληρωματικότητα μεταξύ τους και να έχουν παρόμοιο T_m (θερμοκρασία τήξης).
3. Γενετικό υλικό – αλληλουχία στόχος: ως αρχικό υλικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί DNA ή RNA.
4. Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και Mg^{2+} : για διατήρηση του pH της αντίδρασης.
5. Νουκλεοτίδια (dNTPs): χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας

Σε μια αντίδραση PCR διακρίνονται 3 στάδια, και κάθε ένα πραγματοποιείται σε διαφορετική θερμοκρασία και έχει διαφορετική χρονική διάρκεια.

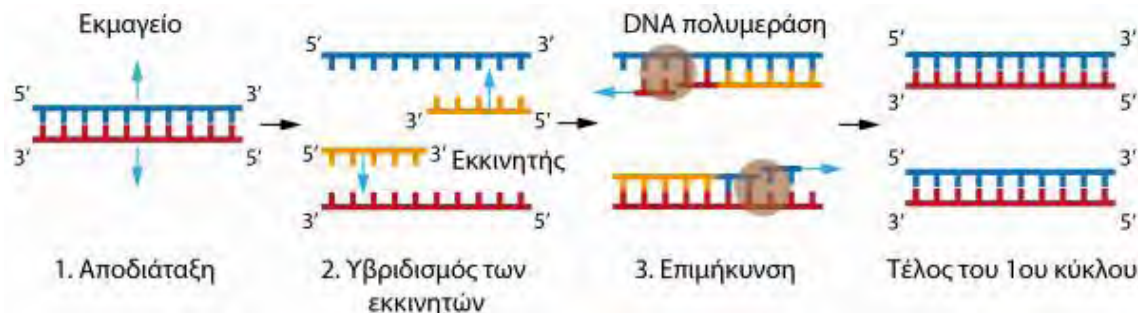
1^ο στάδιο: Αποδιάταξη DNA (denaturation): Οι δύο αλυσίδες του DNA διαχωρίζονται-αποδιατάσσονται (σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων A-T και G-C) με θέρμανση σε θερμοκρασία 94-95°C για περίπου 30sec έως 1min.

2^ο στάδιο: Υβριδοποίηση εκκινητών (annealing): Με μείωση της θερμοκρασίας στους 55-65°C για περίπου 30sec έως 1min, οι εκκινητές οι οποίοι υπάρχουν σε περίσσεια υβριδίζονται σε συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA. Η θερμοκρασία υβριδισμού T_a εξαρτάται από τη σύσταση των εκκινητών σε A-T και G-C και συνήθως είναι 2°C-10°C μικρότερη από τη θερμοκρασία τήξης T_m .

3^ο στάδιο: Επιμήκυνση εκκινητών (extension): Αύξηση της θερμοκρασίας στους 72°C (τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης) για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας. Η πολυμεράση επιμηκώνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs).

Το 3 αυτά στάδια αποτελούν ένα κύκλο και η PCR αντίδραση περιλαμβάνει 35-40 κύκλους. Η PCR λαμβάνει χώρα σε θερμικό κυκλοποιητή (Thermal cycler), συσκευή που φέρει

Θερμαινόμενη πλάκα που μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες, τις οποίες έχει τη δυνατότητα να ρυθμίζει ο χειριστής, ανάλογα με την επιθυμητή θερμοκρασία, με ταχύτητα και ακρίβεια³².



Εικόνα 6: Τα στάδια της αντίδρασης PCR.

2.3.2 Πρωτόκολλο Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)

Εφ' όσον πραγματοποιηθεί η απομόνωση του DNA, στη συνέχεια ακολουθεί η ενίσχυση της περιοχής εκείνης του γονιδιώματος, που περιέχει την αλληλουχία με τον πολυμορφισμό που θα γονοτυπηθεί.

Ύστερα από την απομόνωση του DNA, και πριν ξεκινήσει η διαδικασία προετοιμασίας των PCR αντιδράσεων, έγινε φωτομέτρηση κάθε δείγματος με τη βοήθεια του μηχανήματος NanoDrop με σκοπό την εκτίμηση της συγκέντρωσης έτσι ώστε, να καταλήξουμε στην κατάλληλη ποσότητα η οποία θα πρέπει να προστεθεί στην PCR αντίδραση (50 έως 150ng).



Εικόνα 7: Μηχάνημα NanoDrop.

Σχεδιάστηκαν 3 ζεύγη εκκινητών, ένας πρόσθιος (Forward primer) και ένας ανάστροφος (Reverse primer), για κάθε έναν προς μελέτη πολυμορφισμό. Οι εκκινητές από την Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany), σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PrimerV3 και είχαν σκοπό την ανίχνευση των πολυμορφισμών: FTO rs9939609, MC4R rs17782313 και NEGR1 rs2815752. Στον πίνακα 3 αναφέρονται, οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες του κάθε εκκινητή, καθώς και το μήκος των ενισχυμένων προϊόντων που δίνουν:

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ	ΠΡΪΟΝ PCR (bp)	Tm (°C)
FTO rs9939609	5'- TCAAAACTGGCTCTTGAATGAA -3'	228	59,9
	3'- TGCTCTCCCACTCCATTCT - 5'		59,8
MC4R rs17782313	5'- CTTGGAAGCAGGAAAACCAG -3'	180	59,8
	3'- GCTACCTCAATCCCAGATGC - 5'		59,7
NEGR1 rs2815752	5'- AGGCAGCATGCTCTGTTTTT - 3'	241	60
	3'- TTTCATCCTGCAAGCCTTAAT- 5'		58,8

Πίνακας 3: Εκκινητές για την αντίδραση PCR.

Για τους πολυμορφισμούς που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το HotStarTaq® PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany). Για το πολυμορφισμό FTO πραγματοποιήθηκε μια αντίδραση PCR ενώ, για τους πολυμορφισμούς MC4R και NEGR1 έγινε duplex PCR αντίδραση.

Στον παρακάτω πίνακα 4 καταγράφεται η στοιχειομετρία της PCR αντίδρασης για τον πολυμορφισμό FTO:

PCR (FTO)		
PCR ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
10X Qiagen Buffer (15Mm MgCl ₂)	3μl	3,5mM
MgCl ₂ Solution (25mM)	2,4μl	
dNTPs (5mM each)	3μl	0,5mM
Nuclease- Free Water (QIAGEN)	16,6μl	-
FTO Forward Primer (10pm/μl)	1μl	-
FTO Reverse Primer (10pm/μl)	1μl	-
HotStarTaq DNA Polymerase (5U/μl)	0,5μl	2,5 UNITS/REACTION
DNA	50- 150ng	-

Πίνακας 4: Αντιδραστήρια για την προετοιμασία της PCR αντίδρασης.

Ομοίως, στον πίνακα 5 καταγράφεται η στοιχειομετρία της duplex PCR αντίδρασης για τους πολυμορφισμούς MC4R και NEGR1:

PCR (MC4R/ NEGR1)		
PCR ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
10X Qiagen Buffer (15Mm MgCl ₂)	3μl	3,5mM
MgCl ₂ Solution (25mM)	2,4μl	
dNTPs (5mM each)	3μl	0,5mM
Nuclease- Free Water (QIAGEN)	16,6μl	-
MC4R Forward Primer (10pm/μl)	1μl	-
MC4R Reverse Primer (10pm/μl)	1μl	-
NEGR1 Forward Primer (10pm/μl)	1μl	-
NEGR1 Reverse Primer (10pm/μl)	1μl	-
HotStarTaq DNA Polymerase (5U/μl)	0,5μl	2,5 UNITS/REACTION
DNA	50- 150ng	-

Πίνακας 5: Αντιδραστήρια για την προετοιμασία της PCR αντίδρασης.

Στην αντίδραση PCR, ως τυφλό (BLANK) χρησιμοποιήθηκε απεσταγμένο Nuclease- Free Water (QIAGEN). Τέλος, το μηχάνημα στο οποίο λαμβάνει χώρα η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

είναι ο θερμικός κυκλοποιητής Veriti™ (Applied Biosystems, Foster City, CA), χρησιμοποιώντας το ακόλουθο πρόγραμμα:

ΣΤΑΔΙΟ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ/ ΧΡΟΝΟΣ	ΣΤΟΧΟΣ
1. Αποδιάταξη	96°C / 5min	Ενεργοποίηση Hot Start Taq DNA polymerase
2. Αποδιάταξη	*96°C / 40sec	
3.Υβριδοποίηση εκκινητών	60°C / 40sec	Επανάληψη σταδίων 2 ως 4, 10 φορές
4.Επιμήκυνση εκκινητών	72°C / 1min	
5.Αποδιάταξη	94°C / 40sec	
6.Υβριδοποίηση εκκινητών	60°C / 40sec	Επανάληψη σταδίων 5 ως 7, 25 φορές
7.Επιμήκυνση εκκινητών	72°C / 1min	
8.Hold 1	72°C / 3min	
9.Hold 2	60°C / 30min	Τερματισμός και διατήρηση στους 4-10oC for ever

Πίνακας 6: Συνθήκες προγράμματος για την PCR αντίδραση.

2.4 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

2.4.1 Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια παγκοσμίως διαδεδομένη τεχνική για ανάλυση νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) και πρωτεϊνών. Η τεχνική αυτή βασίζεται στον διαχωρισμό φορτισμένων μορίων (π.χ. DNA, πρωτεΐνες) κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Τα φορτισμένα μόρια κινούνται μέσα στο υπόστρωμα και διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους. Επιπλέον, ειδικά σχεδιασμένες τεχνικές επιτρέπουν την οπτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων με ειδικές χρώσεις, με παρατήρηση σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας ή με αυτοραδιογραφία.

Η πιο κοινή μορφή ηλεκτροφόρησης, είναι η ηλεκτροφόρηση μορίων DNA σε gel αγαρόζης, η οποία γίνεται για τον έλεγχο των προϊόντων της PCR αντίδρασης. Η κινητικότητα των μορίων έχει κατεύθυνση από το αρνητικά (-) φορτισμένο πεδίο προς το θετικά φορτισμένο (+), γεγονός που οφείλεται στο αρνητικό φορτίο των φωσφοδιεστερικών ομάδων του DNA³³.

2.4.2 Πρωτόκολλο ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί πως ενισχύθηκαν οι επιθυμητές περιοχές κατά τη διάρκεια της PCR αντίδρασης, τα προϊόντα PCR φορτώνονται σε πήκτωμα αγαρόζης 2,35% w/v.

Για την παρασκευή του πήκτωματος αγαρόζης χρειάζονται: ρυθμιστικό διάλυμα TBE Buffer 1X, αγαρόζη και βρωμιούχο αιθίδιο.

Όσον αφορά το TBE Buffer 1X, παρασκευάζεται με αραιώση TBE Buffer 20X. Παρακάτω (Πίνακας 7) αναγράφονται τα διαλύματα που είναι απαραίτητα για την παρασκευή TBE Buffer 20X:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΓΙΑ ΤΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΤΕΛΙΚΟΥ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ
Tris (AmpliChem A2264, σκόνη)	432g	 <p>TBE Buffer 20X Αραιώνεται 20 φορές ↓ TBE Buffer 1X</p>
Ορθο Βορικό Οξύ (B(OH) ₃ , Analar Normapur, σκόνη)	220g	
Αυθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA, ArliChem A3145)	160ml	
Απεσταγμένο Νερό	εώς 2lt	

Πίνακας 7: Τα αντιδραστήρια για την παρασκευή TBE ρυθμιστικού διαλύματος. Για τελική συγκέντρωση TBE Buffer 1X αραιώνονται 100ml TBE Buffer 20X σε 1,9lt απεσταγμένου νερού.

Άρα, η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης έχει ως εξής:

1. Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 2,35% ^{w/v}. Αναλυτικότερα, ζυγίζουμε 4g αγαρόζη, ογκομετρούμε 170ml TBE 1X και τοποθετούνται στην ίδια κωνική φιάλη. Στη συνέχεια, το παρασκεύασμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων για λίγα λεπτά μέχρι να πολυμεριστεί η αγαρόζη. Αφαιρούμε την κωνική φιάλη από τον φούρνο και περιμένουμε να μειωθεί η θερμοκρασία του μείγματος (όχι μικρότερη των 60°C, διότι θα πήξει το μείγμα) και προσθέτουμε 8ml βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr 5% ^{w/v}), με σκοπό την χρώση του πηκτώματος, το οποίο έχει την ικανότητα να προσδέεται στο DNA ώστε να είναι εφικτή η παρατήρηση και η φωτογράφιση του σε τράπεζα υπερύδους ακτινοβολίας. Το μείγμα τοποθετείται στο εκμαγείο στο οποίο έχουν τοποθετηθεί «χτενάκια» για τη δημιουργία των «πηγαδιών». Τέλος, αφού πήξει (περίπου 30min) αφαιρούνται τα «χτενάκια» και το πήκτωμα αγαρόζης είναι έτοιμο για χρήση.



Εικόνα 8: Χώρος παρασκευής πηκτώματος αγαρόζης 2,35% ^{w/v}.

2. Τοποθέτηση των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής τους στο πήκτωμα («πηγαδάκια») και εφαρμογή της κατάλληλης ηλεκτρικής τάσης και χρόνου στη δεξαμενή ηλεκτροφόρησης με σκοπό το διαχωρισμό των μορίων. Πιο συγκεκριμένα, για την ηλεκτροφόρηση του δειγμάτων χρησιμοποιείται για κάθε δείγμα Gel Loading Dye Blue (6X) (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts) το οποίο αναμειγνύεται με 5μl PCR product και κάθε δείγμα τοποθετείται σε ξεχωριστό «πηγαδάκι». Εκτός από τα δείγματα, φωρτώνεται παράλληλα σε ένα «πηγαδάκι» 3μl δείκτη μοριακών μεγεθών 100bp Plus Opti-DNA Marker (Abm, Richmond, British Columbia) που θα μας βοηθήσει στην αξιολόγηση των προϊόντων

PCR. Για την ηλεκτροφόρηση παρέχεται συνεχές ρεύμα και αφού πρώτα ρυθμιστεί το τροφοδοτικό στα 135Volt, 200mA και 25Watt η ηλεκτροφόρηση ξεκινάει για 30min.

3. Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας για αξιολόγηση των προϊόντων PCR.

2.5. Γονοτύπηση Πολυμορφισμών

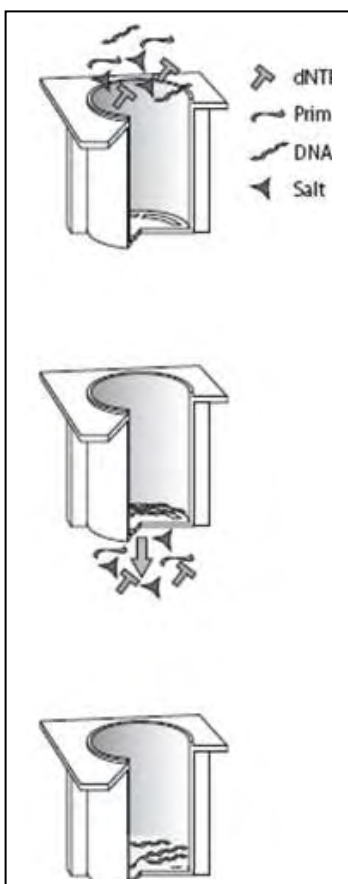
2.5.1 Καθαρισμός προϊόντων PCR

Αφού βεβαιωθεί μέσω της ηλεκτροφόρησης πως η αντίδραση PCR έγινε επιτυχώς, πραγματοποιείται ο καθαρισμός τως προϊόντων PCR.

2.5.1.1 Αρχή της μεθόδου

Τα προϊόντα PCR καθαρίζονται, ώστε να απομακρυνθούν τα άλατα, τα εναπομείναντα ελεύθερα δεοξυριβονουκλεοτίδια και οι εκκινητές με σκοπό αυτό που θα προκύψει να είναι ένα καθαρό υπόστρωμα για την αντίδραση που θα ακολουθήσει.

Το κιτ που χρησιμοποιούμε για τον καθαρισμό προϊόντων PCR είναι το NucleoFast 96 PCR, το οποίο βασίζεται στην υπερδιήθηση και έχει σχεδιάσει για τον γρήγορο καθαρισμό προϊόντων PCR. Κατά τη διάρκεια τη διαδικασίας:



1. Τα προϊόντα PCR φορτώνονται απευθείας NucleoFast 96 PCR διηθητική μεμβράνη.
2. Υπο κενό, τα επιθυμητά προϊόντα PCR συλλέγονται στην υπερδιηθητική μεμβράνη και ουσίες όπως εκκινητές, dNTPs και άλατα φιλτράρονται προς απόρριψη. (Προαιρετικά, τα προϊόντα PCR μπορούν να πλυθούν με RNase-free H₂O.)
3. Τα επιθυμητά προϊόντα PCR ανακτώνται από την μεμβράνη μετά την προσθήκη νερού και σύντομη επώαση. Τα καθαρισμένα προϊόντα PCR είναι έτοιμα για περαιτέρω επεξεργασία, όπως αλληλούχιση.

Εικόνα 9:

Απεικόνιση
καθαρισμού των
προϊόντων PCR.

2.5.1.2 Πρωτόκολλο καθαρισμού προϊόντων PCR

Χρειαζόμαστε:

ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ	ΠΛΑΣΤΙΚΑ	ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ
Αντλία κενού	NucleoFast 96 PCR Plates (Macherey- Nagel)	Nuclease-free Water
Πιπέτα 20-200μL	Πλαστικό 5ml Tray	
Πολυκάναλη πιπέτα 20-300μL	Pasteur Pipettes 1ml	
	0,2ml tubes	
	Γάντια μιας χρήσης	
	Μιας χρήσης DNA/DNase free pipette tips	

Πίνακας 8: Υλικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό των προϊόντων PCR.

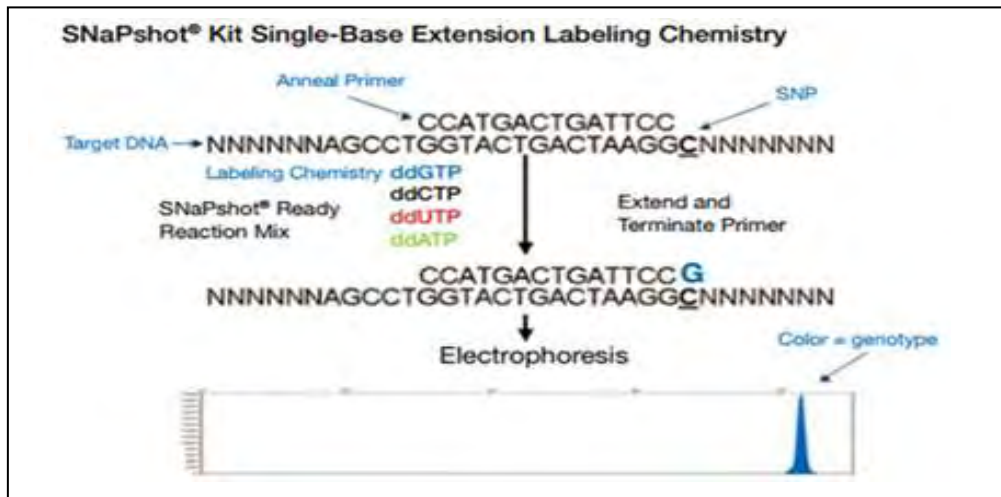
Η διαδικασία καθαρισμού των προϊόντων PCR είναι η ακόλουθη:

1. Γίνεται καταμέτρηση των δειγμάτων που πρόκειται να καθαριστούν και σημειώνουμε στο plate τα «πηγαδάκια» που θα χρησιμοποιηθούν. Επιλέγουμε tubes 0,2ml και σημειώνουμε στα καπάκια τους τους κωδικούς αριθμούς των δειγμάτων.
2. Με μια πολυκάναλη πιπέτα (20-200μl) προστίθονται 80μl Nuclease-free Water στα tubes 0,2ml μέσα στα οποία υπάρχουν τα προϊόντα PCR και γίνεται ανάδευση.
3. Μεταφέρουμε τις αραιωμένες αντιδράσεις PCR στο plate NucleoFast 96 PCR, χρησιμοποιώντας την πολυκάναλη πιπέτα.
4. Τοποθετούμε το plate στην αντλία κενού και εφαρμόζουμε κενό στις 22,5 inches Hg για λίγα λεπτά μέχρι τα «πηγαδάκια» του plate να αδειάσουν. (Ο χρόνος διήθησης ποικίλει ανάλογα με την ποσότητα DNA και τον όγκο της PCR αντίδρασης. Όσο μεγαλύτερος, τόσο μεγαλύτερος και ο χρόνος διήθησης.)
5. Αφού περάσει όλη η ποσότητα νερού που είχε προστεθεί, ξαναπροσθέτουμε 40μl Nuclease-free Water. (Επαναλαμβάνουμε το στάδιο αυτό ακόμα 1 φορά.)
6. Τα καθαρισμένα προϊόντα PCR ανακτώνται χρησιμοποιώντας την πολυκάναλη πιπέτα. Ο όγκος του νερού που χρησιμοποιείται σε αυτό το στάδιο κυμαίνεται από 25μl έως 40μl και αυτό εξαρτάται από την ένταση του προϊόντος PCR, μετά την ηλεκτροφόρηση.
7. Τέλος, προσθέτουμε την κατάλληλη ποσότητα νερού στα «πηγαδάκια» του plate, πιπετάρουμε 50 φορές έτσι ώστε να ξεπλυθεί η διηθητική μεμβράνη και να παραλάβουμε τα καθαρισμένα προϊόντα και ύστερα, τα μεταφέρουμε στα tubes των 0,2ml. Τα προϊόντα PCR είναι πλέον καθαρισμένα και έτοιμα για περαιτέρω επεξεργασία.

2.5.2. Αντίδραση SnapShot

2.5.2.1 Αρχή της μεθόδου

Η ανίχνευση των υπό μελέτη πολυμορφισμών γίνεται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο minisequencing (SnapShot Multiplex System ABI) και με τη χρήση ειδικού εκκινητή για κάθε πολυμορφισμό. Το SNaPshot® Multiplex System είναι μια μέθοδος που βασίζεται στην



επέκταση του εκκινητή που σχεδιάστηκε για την ανάλυση των πολυμορφισμών (SNPs).

ορφισμών (SNPs).

Εικόνα 10: Αρχή της μεθόδου SnapShot και αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων.

Το SNaPshot® Multiplex Kit χρησιμοποιεί μια αντίδραση για να διερευνήσει SNPs σε γνωστές θέσεις. Συγκεκριμένα, βασίζεται στην διδεόξυ-επέκταση μιας μονής βάσης ενός μη σημασμένου ολιγονουκλεοτιδικού εκκινήτη. Κάθε εκκινήτης προσδένεται σε συμπληρωματικό καθαρισμένο προϊόν PCR, παρουσία φθοριζόντων σημασμένων ddNTPs και DNA πολυμεράσης. Η DNA πολυμεράση επεκτείνει τον εκκινήτη κατά ένα νουκλεοτίδιο, προσθέτοντας ddNTP στο 3' άκρο. Η ένδειξη χρώματος φθορισμού αναφέρει ποια βάση προστέθηκε.

Ο πίνακας 9 δείχνει το κάθε χρώμα που αναμένεται για κάθε βάση κατά την ανάλυση:

ΑΖΩΤΟΥΧΑ ΒΑΣΗ	ΤΥΠΟΣ ΒΑΦΗΣ (dye label)	ΧΡΩΜΑ ΠΟΥ ΔΙΕΞΑΓΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟΝ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΑΝΑΛΥΤΗ	
		Πρόσθιος εκκινήτης (Forward)	Ανάστροφος εκκινήτης (Reverse)
A	dR6G	Πράσινο	Κόκκινο
C	dTAMRATM	Μαύρο	Μπλε
G	dR110	Μπλε	Μαύρο
T (U)	dROXTM	Κόκκινο	Πράσινο

Πίνακας 9: Ερωτο-απάντη για τον τύπο βάφης SNaPshot για τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς ανάλογα με τον τύπο του σχεδιασμένου εκκινήτη που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση SNaPshot. Οι εκκινήτες που σχεδιάστηκαν για την SNaPshot αντιδράση είχαν σκοπό την ανίχνευση των μελετώμενων πολυμορφισμών, που αφορούν την αντικατάσταση μιας βάσης. Αναλυτικότερα, ο πολυμορφισμός FTO rs9939609 με αντικατάσταση **T** σε **A**, ο MC4R s17782313 με αντικατάσταση **T** σε **G** και ο NEGR1 rs2815752 με αντικατάσταση **C** σε **T**. Για τον πολυμορφισμό NEGR1 χρησιμοποιήθηκε Reverse primer οπότε αναμένουμε αντικατάσταση **G** σε **A**.

Στον παρακάτω πίνακα 10 καταγράφονται τα στοιχεία των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν:

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ	ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ	ΜΕΓΕΘΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ (bp)
FTO - rs9939609	Forward: TTTTTTTCTAGGTTCTTGC GACTGCTGTGAATTT	36
MC4R - rs17782313	Forward: TTTTTTTTTTTGTTTAAAGCAGGAGAGATTGTATCC	36
NEGR1 - rs2815752	Reverse: TTTTTTTTTCACCCCACTTCTTCTCAAC	30

Πίνακας 10: Στοιχεία των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν.

Είναι σημαντικό για την ανάλυση των αποτελεσμάτων να γνωρίζουμε αν ο εκκινήτης που σχεδιάστηκε για την αντίδραση SNaPshot είναι Forward ή Reverse. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται Forward Primer αζωτούχα βάση που βλέπουμε είναι ίδια με την βάση που αναμένουμε. Ωστόσο, αν χρησιμοποιείται Reverse Primer η βάση που βλέπουμε είναι συμπληρωματική με την βάση που αναμέναμε (βλέπε πίνακα 9).

Προετοιμάζονται δύο ξεχωριστές αντιδράσεις SnapShot, μια για το FTO και μια για το MC4R και NEGR1. Όπως φαίνεται στα πινακάκια 11 και 12 που ακολουθούν προετοιμάζεται το παρακάτω mix αντιδραστηρίων, εκτός από το καθαρισμένο προϊόν PCR το οποίο προστίθεται στο τέλος και μοιράζεται στα αντίστοιχα tubes 0,2ml, για κάθε δείγμα.

Παρακάτω αναγράφεται η στοιχειομετρία για την SnapShot αντίδραση του πολυμορφισμού FTO:

ΑΝΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ SnapShot ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ (FTO)	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix	5μl
Nuclease- free water	3μl
SNaPshot primers FTO	1μl
Καθαρισμένο προϊόν PCR	1μl

Πίνακας 11: Στοιχειομετρία SnapShot αντίδρασης για τον πολυμορφισμό του FTO.

Ομοίως για την SnapShot αντίδραση των πολυμορφισμών MC4R και NEGR1:

ΑΝΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ SnapShot ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ (MC4R, NEGR1)	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix	5μl
Nuclease- free water	3μl
SNaPshot primers MC4R	0,5μl
SNaPshot primers NEGR1	0,5μl
Καθαρισμένο προϊόν PCR	1μl

Πίνακας 12: Στοιχειομετρία SnapShot αντίδρασης για τους πολυμορφισμούς των MC4R και NEGR1.

Εφ' όσον ολοκληρωθεί η προετοιμασία των SnapShot αντιδράσεων, τα δείγματα τοποθετούνται σε PCR συσκευή εκτελώντας το ακόλουθο πρόγραμμα:

ΣΤΑΔΙΟ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ/ ΧΡΟΝΟΣ	ΣΤΟΧΟΣ
1. Αποδιάταξη	96°C / 1min	Αποδιάταξη DNA
2. Αποδιάταξη	96°C / 10sec	
3. Υβριδοποίηση εκκινητών	50°C / 5sec	Επανάληψη σταδίων 2 ως 4, 25 φορές
4. Επιμήκυνση εκκινητών	60°C / 30sec	

5. Hold	60°C / 30min	Τερματισμός και διατήρηση στους 4-10°C for ever
---------	--------------	---

Πίνακας 13: Συνθήκες προγράμματος για την SnapShot αντίδραση.

2.5.3 Απομάκρυνση ddNTPs από τα προϊόντα των SnapShot αντιδράσεων

Μετά το πέρας της SnapShot αντίδρασης τα προϊόντα υφίστανται κατεργασία με ένζυμο αλκαλικής φωσφατάσης (Fast up Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP) ταχείας ανάπτυξης (Fermentas), με σκοπό την απομάκρυνση των εναπομείναντων ελεύθερων διδεόξυριβονουκλεοτιδίων (ddNTPs). Το ένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης είναι υπεύθυνο για την αποφωσφορυλίωση των νουκλεοτιδίων. Στην διαδικασία αυτή, αραιώνουμε 1μl ενζύμου σε 10μl ενζυμικού ρυθμιστικού διαλύματος και από αυτό το mix, προσθέτουμε από 1μl σε κάθε αντίδραση (σε κάθε tube 2ml) ανμιγνύοντας καλά.

Τα tubes τοποθετούνται σε PCR συσκευή, ώστε να πραγματοποιηθεί η ενζυμική αντίδραση φωσφορυλίωσης, ακολουθώντας το παρακάτω πρόγραμμα:

ΣΤΑΔΙΟ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ/ ΧΡΟΝΟΣ	ΣΤΟΧΟΣ
1.Επώαση	37°C / 10min	Ενζυμική αντίδραση
2. Απενεργοποίηση	75°C / 5min	Απενεργοποίηση ενζύμου
5. Hold	4-10°C	Τερματισμός και διατήρηση στους 4-10°C for ever

Πίνακας 14: Συνθήκες προγράμματος για την ενζυμική αντίδραση φωσφορυλίωσης.

2.5.4 Ηλεκτροφόρηση σημασμένων προϊόντων της SnapShot αντίδρασης, στον γενετικό αναλυτή και ανάλυση αποτελεσμάτων

Ολοκληρώνοντας τον καθαρισμό των προϊόντων SnapShot, προστίθονται 9μl φορμαμίδιου (HI-DI), 0,3μl από τον πρότυπο δείκτη μοριακών μεγεθών, ladder (GeneScan 120-LIZ) και 2,5μl από τα SnapShot προϊόντα σε plate 96 θέσεων- πηγαδιών. Έπειτα, το plate τοποθετείται σε PCR συσκευή στους 95°C για 5min, ώστε να αποδιαταχθούν τα προϊόντα. Τέλος, προετοιμάζεται ο γενετικός αναλυτής 3130xl ABI, στη συνέχεια φορτώνεται το plate, ξεκινάει η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης και αφού τελειώσει γένται η ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων στο γενετικό αναλυτή επιλέγονται οι ρυθμίσεις Dye Set E5 και SNP36_POP6 με POP7 polymer και ladder GeneScan 120-LIZ . Η ανάλυση των

αποτελεσμάτων πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας το λογισμικό GeneScanAnalysis Software version 3.5 και προεπιλεγμένα πρότυπα παραμέτρων ανάλυσης GeneScan-120 LIZ.

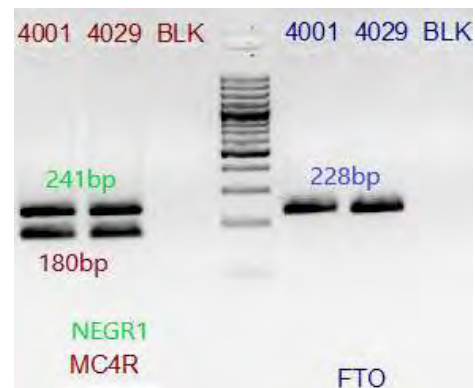
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Εξαγωγή και ανάλυση αποτελεσμάτων

Η γονοτύπηση των πολυμορφισίων, rs9939609 του γονιδίου FTO, rs17782313 του γονιδίου MC4R και rs2815752 του γονιδίου NEGR1 πραγματοποιήθηκε σε μια ομάδα 150 ατόμων Ελληνικού, γενικού πληθυσμού.

Για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων των προαναφερόμενων υπό μελέτη πολυμορφισμών, που αφορούν την αντικατάσταση μιας βάσης, αρχικά, έγινε για κάθε δείγμα, μια αντίδραση PCR για τον πολυμορφισμό του γονιδίου FTO και μια duplex PCR αντίδραση για τους πολυμορφισμούς των γονιδίων MC4R και NEGR1.

Έπειτα, τα προϊόντα των PCR αντιδράσεων ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης 2,35 %/v. Μετά το πέρας της ηλεκτοφόρησης, αναμένουμε για τον πολυμορφισμό του FTO προϊόν 228bp, για τον πολυμορφισμό του MC4R προϊόν 180bp και τον πολυμορφισμό του NEGR1 προϊόν 241bp όπως φαίνεται στην εικόνα 11 που αποτελεί ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα των ηλεκροφορήσεων όλων των δειγμάτων.



Εικόνα 11: Ηλεκροφόρηση PCR προϊόντων.

Στη συνέχεια, τα PCR προϊόντα που είχαν ενισχυθεί επιτυχώς, καθαρίστηκαν και αραιώθηκαν σε τελικό όγκο, ο οποίος εξαρτήθηκε από τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης και ακολούθησε προετοιμασία της SnapShot αντίδρασης. Αναλυτικότερα, για την SnapShot αντίδραση χρειάστηκε να γίνουν δύο διαφορετικές αντιδράσεις για κάθε δείγμα, επειδή οι εκκινητές των πολυμορφισμών των γονιδίων FTO και MC4R, είχαν το ίδιο μήκος βάσεων και επομένως, θα προέκυπταν προϊόντα τα οποία ομοίως θα είχαν το ίδιο μήκος βάσεων και άρα, στην τελική εικόνα θα συνέπιπταν οι κορυφές αυτών και δεν θα μπορούσε να αναλυθεί το αποτέλεσμα. Επομένως, για τον πολυμορφισμό του FTO προετοιμάστηκε μια αντίδραση SnapShot ενώ, για τους πολυμορφισμούς των MC4R και NEGR1 μια duplex αντίδραση.

Στο σημείο αυτό, να σημειωθεί πως για τους πολυμορφισμούς rs9939609 του γονιδίου FTO και rs17782313 του γονιδίου MC4R σχεδιάστηκαν πρόσθιοι εκκινητές (Forward primers) ενώ, για τον πολυμορφισμό rs2815752 του γονιδίου NEGR1 σχεδιάστηκε ανάστροφος εκκινητής (Reverse primer). Με βάση τα παραπάνω δεδομένα και βάση τα στοιχεία του πίνακα 9 και 15 προκύπτουν τα παρακάτω στοιχεία όπου καταγράφονται οι αντιστοιχίες κάθε χρώματος με την αζωτούχα βάση, ανάλογα με τον εκκινητή.

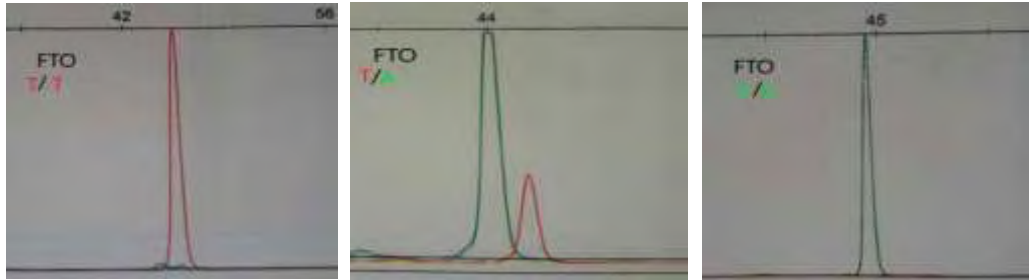
Πολυμορφισμός	Τύπος Εκκινητή	Βάση που βλέπουμε	Χρώμα	Βάση που αναμένουμε
rs9939609 (T>A) του γονιδίου FTO	Πρόσθιος (Forward Primer)	Θυμίνη (T)	Κόκκινο	Θυμίνη (T)
		Αδενίνη (A)	Πράσινο	Αδενίνη (A)
rs17782313 (T>C) του γονιδίου MC4R	Πρόσθιος (Forward Primer)	Θυμίνη (T)	Κόκκινο	Θυμίνη (T)
		Κυτοσίνη (C)	Μαύρο	Κυτοσίνη (C)
rs2815752 (G>A) του γονιδίου NEGR1	Ανάστροφος (Reverse Primer)	Γουανίνη (G)	Μπλε	Κυτοσίνη (C)
		Αδενίνη (A)	Πράσινο	Θυμίνη (T)

Πίνακας 15: Αντιστοιχίες κάθε χρώματος με την αζωτούχα βάση ανάλογα με τον εκκινητή.

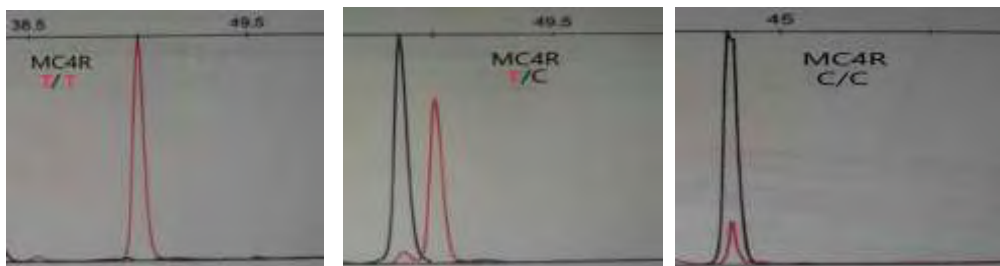
Τέλος, αφού ολοκληρώθηκαν όλες οι διεργασίες, ηλεκτροφορήθηκαν τα SnapShot προϊόντα σε γενετικό αναλυτή. Να σημειωθεί πως τα προϊόντα μικρότερου μεγέθους περνάνε πρώτα μέσα από τα τριχοειδή του γενετικού αναλυτή και άρα περνάνε πρώτα από τη δεσμίδα μονοχρωματικού φωτός (laser). Επομένως, για τα SnapShot προϊόντα μικρότερου μεγέθους δίνεται πρώτα το σήμα και στη συνέχεια ακολουθούν τα μεγαλύτερα μεγέθους προϊόντα.

Στις παρακάτω εικόνες (εικόνες 12,13,14) απεικονίζονται 9 παραδείγματα που αντιπροσωπεύουν κάθε άτομο με αντίστοιχο γονότυπο.

Για τον πολυμορφισμό του FTO, τα ομόζυγα άτομα T/T παρουσιάζουν μειωμένο κίνδυνο για ανάπτυξη παχυσαρκίας ενώ, τα ετερόζυγα, για τον πολυμορφισμό T/A άτομα και τα ομόζυγα A/A παρουσιάζουν 1,3 και 1,6 φορές αντίστοιχα μεγαλύτερο κίνδυνο για εμφάνιση



Εικόνα 12: Αποτελέσματα SNaPshot, για τον πολυμορφισμό rs9939609 του γονιδίου

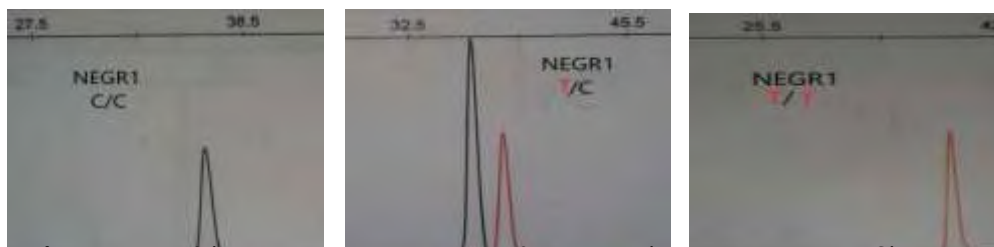


Εικόνα 13: Αποτελέσματα SNaPshot, για τον πολυμορφισμό rs17782313 του γονιδίου MC4R.

υψηλότερου BMI και παχυσαρκίας.

Για τον πολυμορφισμό του MC4R, τα ομόζυγα άτομα T/T εμφανίζουν BMI στα πλαίσια του φυσιολογικού ενώ, οι ετερόζυγοι για τον πολυμορφισμό T/C και ομόζυγοι C/C παρουσιάζουν υψηλότερο BMI κατά 0,22 και 0,44 μονάδες αντίστοιχα.

Τα ομόζυγα άτομα για το αλληλόμορφο κινδύνου του γονιδίου NEGR1, A/A παρουσιάζουν μεγαλύτερο κίνδυνο για ανάπτυξη παχυσαρκίας σε σχέση με τα ομόζυγα για το προστατευτικό



Εικόνα 14: Αποτελέσματα SNaPshot, για τον πολυμορφισμό rs2815752 του γονιδίου NEGR1.

αλληλόμορφο (G/G). Εφόσον, έχει χρησιμοποιηθεί Reverse primer τα ομόζυγα άτομα για το προστατευτικό αλληλόμορφο απεικονίζονται ως C/C, τα ετερόζυγα C/T και τα ομόζυγα για το αλληλόμορφο κινδύνου ως T/T.

3.2 Παρουσίαση και επεξεργασία αποτελεσμάτων

3.2.1 Παρουσίαση των αποτελεσμάτων γονοτύπησης των υπό μελέτη πολυμορφισμών

Στον παρακάτω πίνακα 16 αναγράφονται απαραίτητες πληροφορίες για τους πολυμορφισμούς, τους γονότυπους και το αντίστοιχο προφίλ.

Πολυμορφισμός	Γονότυπος	Φαινοτυπικό Προφίλ
rs9939609 του γονιδίου FTO	T/T	Μειωμένος κίνδυνος εμφάνισης παχυσαρκίας, φυσιολογικό BMI
	T/A	Αυξημένος κίνδυνος 1,3 φορές εμφάνισης παχυσαρκίας
	A/A	Αυξημένος κίνδυνος 1,6 φορές εμφάνισης παχυσαρκίας
rs17782313 του γονιδίου MC4R	T/T	Μειωμένος κίνδυνος εμφάνισης παχυσαρκίας, φυσιολογικό BMI
	T/C	Αυξημένο BMI κατά 0,22 μονάδες
	C/C	Αυξημένο BMI κατά 0,44 μονάδες
rs2815752 του γονιδίου NEGR1	G/G	Μειωμένος κίνδυνος εμφάνισης παχυσαρκίας, φυσιολογικό BMI
	G/A	Αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης παχυσαρκίας και ηψηλότερου BMI
	A/A	Αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης παχυσαρκίας και ηψηλότερου BMI

Πίνακας 16: Φαινοτυπικά στοιχεία των μελετώμενων πολυμορφισμών.

Αποτελέσματα γονοτύπησης των πολυμορφισμών rs9939609 του γονιδίου FTO, rs17782313 του γονιδίου MC4R και rs2815752 του γονιδίου NEGR1.

No Δείγματος	Φύλο (Γ ή Α)	FTO rs9939609	MC4R rs17782313	NEGR1 rs2815752
1	A	T/T	T/T	G/G
2	Γ	T/A	T/C	G/G
3	A	A/A	T/T	G/G
4	A	T/T	T/T	G/G
5	Γ	T/A	T/T	A/A
6	A	T/T	T/C	G/G
7	A	T/A	T/C	A/A
8	Γ	A/A	T/T	G/G
9	A	T/A	T/T	G/G
10	Γ	A/A	T/T	G/A
11	Γ	T/T	T/T	A/A
12	A	T/A	T/T	A/A
13	A	T/A	T/T	G/A
14	A	T/A	T/C	A/A
15	Γ	T/T	T/C	G/G
16	Γ	T/A	T/T	G/A
17	Γ	T/A	T/C	G/A
18	A	T/A	T/C	G/A
19	A	A/A	T/C	G/A
20	Γ	T/A	T/C	G/A
21	Γ	T/A	T/C	G/A
22	A	T/A	T/C	G/A
23	Γ	T/A	T/T	G/G
24	Γ	T/A	T/C	A/A
25	Γ	T/A	T/C	G/A
26	Γ	T/A	T/T	G/A
27	Γ	A/A	T/T	A/A
28	Γ	T/T	T/T	A/A
29	A	T/T	T/T	A/A
30	Γ	A/A	T/C	A/A
31	Γ	T/T	T/C	A/A
32	A	T/A	T/C	G/A
33	Γ	T/A	T/T	G/A
34	Γ	T/A	T/C	A/A
35	Γ	A/A	T/C	G/A
36	Γ	T/T	T/T	G/A
37	A	T/T	T/T	G/A
38	A	T/A	T/C	A/A
39	A	A/A	T/T	A/A
40	A	T/A	T/C	G/A
41	A	T/T	T/T	A/A

42	Г	T/A	C/C	G/A
43	A	A/A	T/T	G/A
44	A	T/A	T/C	A/A
45	A	T/A	T/T	G/A
46	A	T/A	T/T	A/A
47	A	T/A	T/C	A/A
48	A	T/A	T/C	G/G
49	A	T/T	T/T	G/A
50	Г	T/A	T/C	G/A
51	A	T/T	T/C	A/A
52	Г	A/A	T/C	G/G
53	A	T/A	T/T	A/A
54	A	T/T	T/T	A/A
55	A	T/A	T/T	A/A
56	A	A/A	T/T	A/A
57	A	T/A	T/C	G/A
58	Г	T/A	T/C	A/A
59	Г	T/T	T/T	G/A
60	A	A/A	T/T	G/A
61	A	T/T	C/C	A/A
62	Г	T/A	T/T	G/A
63	Г	T/T	T/T	G/A
64	A	T/T	T/T	A/A
65	A	T/A	T/T	A/A
66	A	T/T	T/T	G/A
67	Г	A/A	T/C	G/A
68	A	T/A	T/T	G/G
69	A	T/T	T/T	A/A
70	Г	T/A	T/C	A/A
71	Г	T/A	T/C	A/A
72	A	T/A	T/T	G/G
73	Г	A/A	T/C	A/A
74	Г	T/T	T/C	G/A
75	A	A/A	T/C	A/A
76	Г	T/A	T/C	A/A
77	Г	T/T	T/C	A/A
78	Г	T/T	T/T	A/A
79	A	T/T	T/T	A/A
80	A	T/A	T/T	G/G
81	A	T/A	C/C	G/G
82	A	T/A	T/T	G/G
83	A	T/T	T/T	A/A
84	Г	A/A	T/C	G/A
85	Г	T/T	T/C	A/A
86	Г	T/A	T/C	A/A

87	Г	T/T	T/C	A/A
88	A	T/T	T/T	G/G
89	Г	T/T	T/C	A/A
90	Г	T/T	T/T	A/A
91	Г	T/A	T/C	A/A
92	A	T/A	T/C	G/A
93	A	A/A	T/T	G/A
94	Г	A/A	T/T	G/A
95	Г	A/A	T/T	G/A
96	Г	T/T	T/C	A/A
97	Г	T/T	T/C	G/A
98	Г	T/A	T/C	G/A
99	A	T/T	T/C	G/A
100	A	A/A	T/C	G/A
101	Г	T/A	T/T	A/A
102	Г	T/T	C/C	A/A
103	A	T/T	T/C	A/A
104	Г	T/T	T/T	A/A
105	A	A/A	T/C	G/G
106	A	T/A	T/T	A/A
107	A	T/T	T/C	A/A
108	A	A/A	T/C	G/A
109	Г	T/A	T/C	A/A
110	Г	T/T	T/C	G/A
111	Г	T/A	T/T	G/G
112	Г	T/T	T/T	A/A
113	Г	A/A	T/T	G/A
114	A	A/A	T/T	A/A
115	A	T/A	T/C	A/A
116	Г	T/T	T/T	A/A
117	Г	T/T	C/C	G/A
118	Г	T/T	T/C	G/A
119	A	T/A	T/C	G/G
120	Г	A/A	T/T	A/A
121	Г	T/A	T/T	G/A
122	Г	T/A	T/T	G/A
123	Г	T/A	T/T	G/A
124	Г	T/T	T/T	A/A
125	A	T/A	T/T	G/G
126	A	A/A	T/C	A/A
127	Г	T/T	T/C	A/A
128	Г	T/T	C/C	A/A
129	Г	T/A	T/C	A/A
130	A	T/A	C/C	A/A
131	Г	A/A	T/T	A/A

132	Γ	T/T	T/T	G/A
133	Γ	T/T	T/C	G/G
134	A	A/A	T/C	G/G
135	Γ	A/A	T/T	A/A
136	Γ	A/A	T/T	G/A
137	A	T/A	T/T	A/A
138	Γ	T/A	T/T	G/G
139	A	T/A	T/T	G/A
140	Γ	T/T	T/C	G/A
141	A	T/A	T/T	G/A
142	Γ	A/A	T/T	G/G
143	Γ	T/A	T/C	G/A
144	Γ	A/A	T/T	A/A
145	Γ	T/A	T/T	A/A
146	Γ	A/A	T/C	A/A
147	Γ	T/T	C/C	A/A
148	Γ	T/Tα	T/T	G/A
149	A	A/A	T/C	G/G
150	A	T/T	T/T	A/A

Πίνακας 17: Αποτελέσματα γονοτύπησης. (Γ: Γυναίκα, Α: Άνδρας) Για τον πολυμορφισμό rs9939609 του γονιδίου FTO το **T** είναι το προστατευτικό και το **A** το αλληλόμορφο κινδύνου. Για τον πολυμορφισμό rs17782313 του γονιδίου MC4R το **T** είναι το προστατευτικό αλληλόμορφο και το **C** το αλληλόμορφο κινδύνου. Για τον πολυμορφισμό rs2815752 του γονιδίου NEGR1 το **G** είναι το προστατευτικό αλληλόμορφο και το **A** το αλληλόμορφο κινδύνου.

3.2.2 Επεξεργασία αποτελεσμάτων για τους πολυμορφισμούς rs9939609 του γονιδίου FTO, rs17782313 του γονιδίου MC4R και rs2815752 του γονιδίου NEGR1 σε Ελληνικό, γενικό πληθυσμό

Μελετώντας τα παραπάνω αποτελέσματα υπολογίστηκαν το πλήθος και οι συχνότητες εμφάνισης των γονοτύπων και των αλληλομόρφων των πολυμορφισμών rs9939609 του γονιδίου FTO, rs17782313 του γονιδίου MC4R και rs2815752 του γονιδίου NEGR1.

Να σημειωθεί πως η συχνότητα εμφάνισης των αλληλομόρφων για κάθε πολυμορφισμό προκύπτει από το άθροισμα του διπλάσιου του πλήθους (N) των ομόζυγων για το αλληλόμορφο, συν το πλήθος των ετερόζυγων ατόμων για τον πολυμορφισμό, δηλαδή:

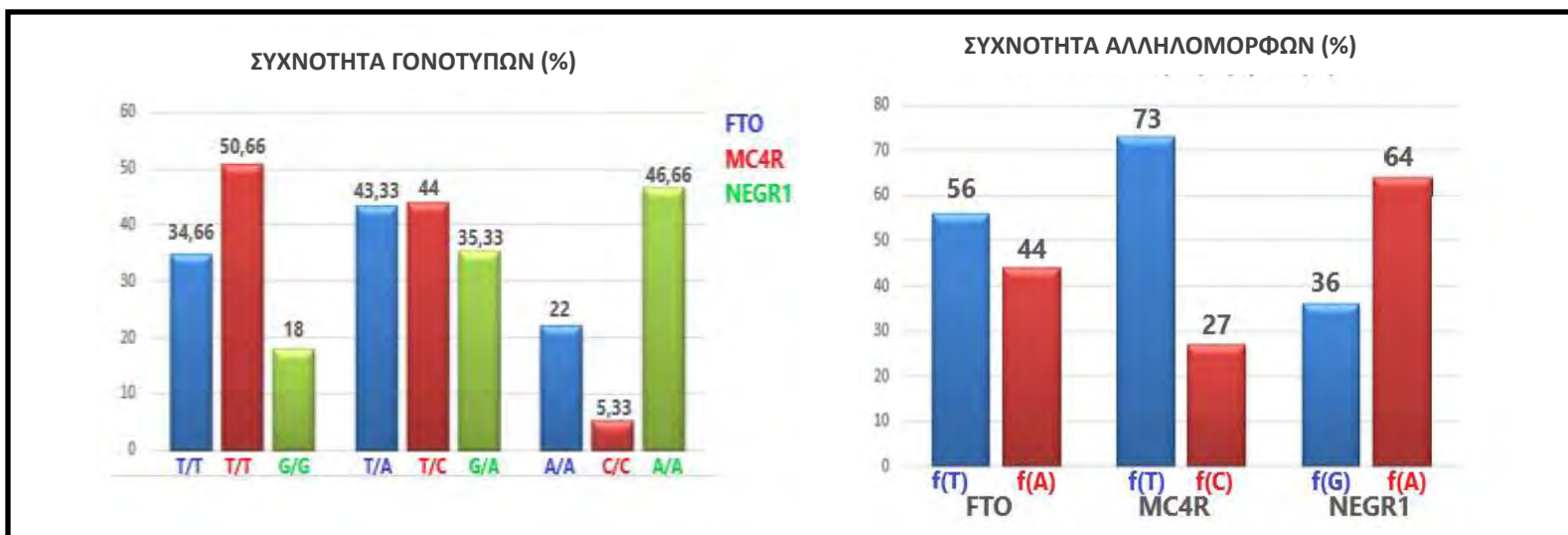
$$f_{(\text{αλληλομόρφου})} = 2 \times N_{(\text{ομόζυγων})} + N_{(\text{ετερόζυγων})}$$

Παρακάτω δίνονται τα αποτελέσματα για την γονοτυπική και αλληλική συχνότητα εμφάνισης των υπό μελέτη πολυμορφισμών:

Συχνότητα εμφάνισης Γονοτύπων			Συχνότητα εμφάνισης Αλληλομόρφων		
Πολυμορφισμός	Σύνολο ατόμων (N)	Ποσοστό (%)	Πολυμορφισμός	Σύνολο αλληλομόρφων (N)	Ποσοστό (%)
FTO - rs9939609					
T/T	52	34,66	FTO - rs9939609	(T)= 169	56,33
T/A	65	43,33		(A)= 131	43,66
A/A	33	22			
MC4R - rs17782313					
T/T	76	50,66	MC4R - rs17782313	(T)= 218	72,66
T/C	66	44		(C)= 82	27,33
C/C	8	5,33			
NEGR1 - rs2815752					
G/G	27	18	NEGR1 - rs2815752	(G)= 107	35,66
G/A	53	35,33		(A)= 193	64,33
A/A	70	46,66			

Πίνακας 18: Ανάλυση αποτελεσμάτων για τους πολυμορφισμούς.

Στη συνέχεια, παρατίθενται τα γραφήματα 1,2 που προκύπτουν από τα στοιχεία του παραπάνω



Διαγράμματα 1,2: Ποσοστά γονοτύπων και αλληλομόρφων των 3 υπό μελέτη πολυμορφισμών.

πίνακα:

Με βάση λοιπόν όλα τα παραπάνω, από το σύνολο των 150 ατόμων που μελετήθηκαν, για τον πολυμορφισμό rs9939609 του γονιδίου FTO γονοτυπήθηκαν 52 άτομα ως ομόζυγα για το προστατευτικό αλληλόμορφο T, ποσοστό 34,66%, εμφανίζοντας χαμηλό κίνδυνο εκδήλωσης παχυσαρκίας, 65 άτομα ως ετερόζυγα για τον πολυμορφισμό, ποσοστό 43,33% με 1,3 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για εμφάνιση παχυσαρκίας και 33 άτομα ως ομόζυγα για το αλληλόμορφο

κινδύνου A, ποσοστό 22% με 1,6 φορές υψηλότερο κίνδυνο για εμφάνιση παχυσαρκίας. Από το σύνολο των 300 αλληλομόρφων το ποσοστό εμφάνισης του αλληλόμορφου κινδύνου ήταν 44%.

Στη συνέχεια, για τον πολυμορφισμό rs17782313 του γονιδίου MC4R, 76 άτομα γονοτυπήθηκαν ως ομόζυγα για το προστατευτικό αλληλόμορφο T, ποσοστό 50,66% εμφανίζοντας φυσιολογικές τιμές BMI, 66 άτομα ως ετερόζυγα για τον πολυμορφισμό, ποσοστό 44% έχοντας μεγαλύτερο BMI κατά 0,22 μονάδες και 8 άτομα ως ομόζυγα για το αλληλόμορφο κινδύνου C, ποσοστό 5,33% έχοντας υψηλότερο BMI κατά 0,44 μονάδες. Από το σύνολο των 300 αλληλομόρφων το ποσοστό εμφάνισης του αλληλόμορφου κινδύνου ήταν 27%.

Τέλος, όσον αφορά τον πολυμορφισμό rs2815752 του γονιδίου NEGR1, 27 άτομα γονοτυπήθηκαν ως ομόζυγα για το προστατευτικό αλληλόμορφο G, ποσοστό 18% παρουσιάζοντας μειωμένο κίνδυνο για εμφάνιση παχυσαρκίας και φυσιολογικό BMI, 53 άτομα ως ετερόζυγα για τον πολυμορφισμό, ποσοστό 35,33% και 70 άτομα ως ομόζυγα για το αλληλόμορφο κινδύνου A, ποσοστό 46,66% εμφανίζοντας αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση παχυσαρκίας και υψηλότερο BMI. Από το σύνολο των 300 αλληλομόρφων το ποσοστό εμφάνισης του αλληλόμορφου κινδύνου ήταν 64%.

Επιπροσθέτως, διαχωρίζοντας τα 150 άτομα σε άντρες και γυναίκες, και μελετώντας τα στοιχεία του πίνακα 19 που ακολουθεί, παρατηρήθηκε πως στον πολυμορφισμό του NEGR1 υπάρχουν ορισμένες διαφορές εμφάνισης των γονοτύπων και αλληλομόρφων μεταξύ των 2 φύλων.

Συχνότητα εμφάνισης Γονοτύπων					Συχνότητα εμφάνισης αλληλομόρφων				
Πολυμορφισμός	Σύνολο ατόμων		Ποσοστό (%)		Πολυμορφισμός	Σύνολο αλληλομόρφων		Ποσοστό (%)	
	Γ	A	Γ	A		Γ	A	Γ	A
FTO - rs9939609									
T/T	31	20	37,8	29,41					
T/A	32	33	39,02	48,52	FTO - rs9939609	(T)=94	(T)=73	57,31	53,68

Πίνακας 19: Ανάλυση αποτελεσμάτων για τους πολυμορφισμούς, μεταξύ των δύο φύλων. (Γ: Γυναίκα, Α: Άνδρας)

A/A	19	15	23,17	22,05		(A)=70	(A)=63	42,69	46,32
MC4R - rs17782313									
T/T	38	38	46,34	55,88					
T/C	39	27	47,56	39,7	MC4R	(T)=115	(T)=103	70,12	75,73
					rs17782313				
C/C	5	3	6,09	4,41		(C)=49	(C)=33	29,88	24,26
NEGR1 - rs2815752									
G/G	9	17	10,97	25					
G/A	34	20	41,46	29,41	NEGR1 - rs2815752	(G)=52	(G)=54	31,7	39,7
A/A	39	31	47,56	45,58		(A)=112	(A)=82	68,3	60,3

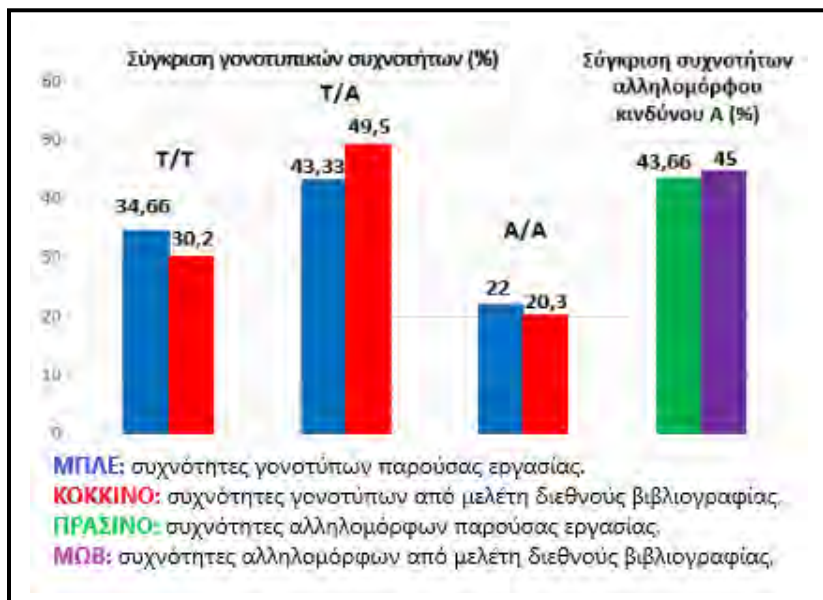
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Μελέτες συσχέτισης γονιδιώματος (GWAS), με τη χρήση πολυμορφισμών ενός νουκλεοτιδίου (SNPs) έχουν εντοπίσει περισσότερες από 40 γενετικές παραλλαγές μέχρι σήμερα που σχετίζονται με υψηλότερο BMI και κίνδυνο για εμφάνιση παχυσαρκίας. Μεταξύ αυτών των γενετικών παραλλαγών είναι και οι 3 υπό μελέτη πολυμορφισμοί της παρούσας εργασίας. Πιο συγκεκριμένα, ο πολυμορφισμός rs9939609 του γονιδίου FTO, ο πρώτος αναμφισβήτητα συνδεδεμένος με παχυσαρκία, ο πολυμορφισμός rs17782313 του γονιδίου MC4R, ο δεύτερος σημαντικότερος σχετιζόμενος με αυξημένο BMI και ο πολυμορφισμός rs2815752 του γονιδίου NEGR1, από τους πιο πρόσφατους συσχετιζόμενους πολυμορφισμούς^{15,30}.

Αναλυτικότερα, η πρωτεΐνη FTO εκφράζεται σε διάφορους ιστούς, με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στον υποθάλαμο και στο πάγκρεας και επομένως, θα μπορούσε να αποτελέσει βασική σύνδεση μεταξύ του κεντρικού νευρικού συστήματος και του ενεργειακού ισοζυγίου. Ακόμη, η πρωτεΐνη FTO αποτελεί μέλος της μη-εγκεφαλικής και 2-οξογλουταρικής εξαρτώμενης οξυγενάσης με δραστηριότητα απομεθυλίωσης νουκλεϊκού οξέος³⁴. Το rs9939609 FTO SNP είναι ένα από τα δέκα SNPs στο πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου FTO, το οποίο βρέθηκε ότι σχετίζεται με αυξημένο βάρος και BMI. Πρόκειται για αντικατάσταση της θυμίνης (T: προστατευτικό αλληλόμορφο) με αδενίνη (A: αλληλόμορφο κινδύνου)³⁵.

Μελέτες έχουν δείξει σημαντική συνάφεια του πολυμορφισμού rs9939609 με την παχυσαρκία σε Ευρωπαϊκό, Αφροαμερικάνικο και μερικούς πληθυσμούς Ασιατικής προέλευσης. Πιο αναλυτικά, σε έρευνα όπου μελετήθηκαν 1.244 κάτοικοι των περιοχών της Μόσχας και του Σβερντλόβσκ, η συχνότητα των ομόζυγων (T/T) για το προστατευτικό αλληλόμορφο ήταν 30,2%, των ετερόζυγων (T/A) και των ομόζυγων για το αλληλόμορφο κινδύνου (A/A) ήταν αντίστοιχα 49,5% και 20,3%. Στην ίδια μελέτη, βρέθηκε πως η συχνότητα εμφάνισης του συγκεκριμένου πολυμορφισμού δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές μεταξύ γυναικών και ανδρών, με ποσοστά 48,4% και 42,5% αντίστοιχα και συνολική συχνότητα εμφάνισης αλληλόμορφου κινδύνου (A) 45,1%³⁶, ποσοστό που συμπίπτει με ανάλογη έρευνα σε 38.759 λευκούς Ευρωπαίους και έρευνα σε Γαλλικό και Ρουμάνικο πληθυσμό με συχνότητες αλληλομόρφου κινδύνου 45% και 49,5% αντίστοιχα^{34,35}.

Παρακάτω, παρατίθενται το διάγραμμα 3 και ο πίνακας 20 έτσι ώστε, να είναι εφικτή η καλύτερη επεξεργασία των αποτελεσμάτων, για τον πολυμορφισμό του FTO, της παρούσας εργασίας και των μελετών διεθνούς βιβλιογραφίας.



Σύγκριση συχνοτήτων εμφάνισης αλληλομόρφου κινδύνου (A) μεταξύ Γυναικών και Ανδρών (%)			
Γυναίκες		Άνδρες	
Πείραμα	Άρθρο	Πείραμα	Άρθρο
42,69	48,4	46,32	42,5

Πίνακας 20: Σύγκριση ανδρών και γυναικών για το FTO.

Με βάση το διάγραμμα 3, παρατηρείται πως δεν υπάρχουν διαφορές ούτε στις γονοτυπικές, ούτε και στις αλληλομορφικές συχνότητες μεταξύ των αποτελεσμάτων των ατόμων Ελληνικής καταγωγής της παρούσας εργασίας και των κατοίκων της Μόσχας και του Σβερντλόβσκ της μελέτης της διεθνούς βιβλιογραφίας³⁶, όσον αφορά τον μελετώμενο πολυμορφισμό του FTO γονιδίου. Επομένως, δεν υφίστανται εθνοτικές διαφορές μεταξύ ατόμων Ευρωπαϊκής καταγωγής.

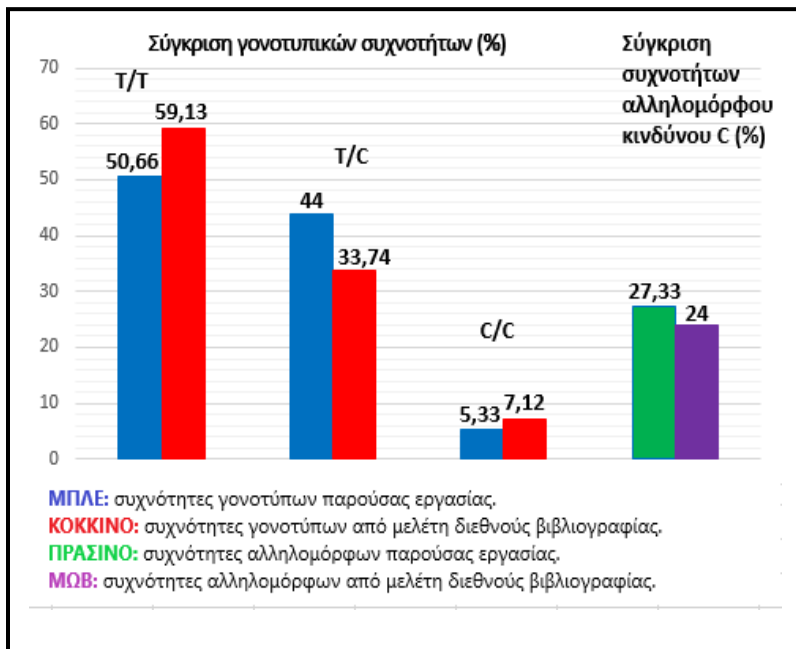
Διάγραμμα 3: Σύγκριση γονοτυπικών και αλληλομορφικών συχνοτήτων μεταξύ της παρούσας και της μελέτης διεθνούς βιβλιογραφίας σε κατοίκους της Μόσχας και του Σβερντλόβσκ³⁶, για τον πολυμορφισμό του FTO.

Στη συνέχεια, ο υποδοχέας της μελανοκορτίνης 4 (MC4R) φαίνεται να είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής της παχυσαρκίας. Ειδικότερα, ο MC4R ανήκει σε μια οικογένεια υποδοχέων συζευγμένων με G-πρωτεΐνη (GPCR) και εκφράζεται στον υποθάλαμο, ελέγχοντας την πρόσληψη τροφής και διατηρώντας το ενεργειακό ισοζύγιο σε ισορροπία³⁷. Όσον αφορά τον πολυμορφισμό rs17782313 πρόκειται για αντικατάσταση θυμίνης (T: προστατευτικό αλληλόμορφο) με κυτοσίνη (C: αλληλόμορφο κινδύνου).

Μελέτες συσχέτισης γονιδιώματος αποδεικνύουν πως ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός του MC4R σχετίζεται άμεσα με αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση παχυσαρκίας σε Ευρωπαίους

(Καυκάσιους) και Ασιάτες. Συγκεκριμένα, από τα δεδομένα μελέτης που διεξήχθη στο Τορόντο και αφορούσε 323 άτομα ηλικίας 24 έως 50 ετών Ευρωπαϊκής καταγωγής, βρέθηκαν ως ομόζυγοι (T/T) για το προστατευτικό αλληλόμορφο το 59,13% του συνόλου, ετερόζυγοι (T/C) και ομόζυγοι (C/C) για το αλληλόμορφο κινδύνου 33,74% και 7,12% αντίστοιχα με συχνότητα εμφάνισης αλληλομόρφου κινδύνου (C) 24%²⁵, ποσοστό που παρουσιάζει συνάφεια με έρευνα που αφορούσε 8.830 ενήλικες Κορεάτες ηλικίας 40 έως 69 ετών, και η συχνότητα εμφάνισης του αλληλομόρφου κινδύνου ήταν 25%³⁸. Επιπλέον, μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Λείψιγ της Γερμανίας και αφορούσε 221 λευκούς από του οποίους οι 116 ήταν γυναίκες και οι 105 ήταν άνδρες, διαπιστώθηκε πως ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός επίσης δεν είχε σημαντικές διαφορές μεταξύ του γυναικείου και του ανδρικού πληθυσμού, καθώς η συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού για τις γυναίκες, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της δεδομένης έρευνας ήταν 25,71% και για τους άνδρες 24,15%²⁶.

Στο διάγραμμα 4 και στον πίνακα 21 που ακολουθούν συνοψίζονται οι γονοτυπικές και οι αλληλομορφικές συχνότητες της παρούσας μελέτης και των ερευνών που αναφέρθηκαν παραπάνω για ευκολότερη σύγκριση των αποτελεσμάτων που αφορούν τον πολυμορφισμό του MC4R.



Γυναίκες		Άνδρες	
Πείραμα	Άρθρο	Πείραμα	Άρθρο
29,88	25,71	24,26	24,15

Πίνακας 21: Σύγκριση ανδρών και γυναικών για το MC4R.

Διάγραμμα 4: Σύγκριση γονοτυπικών και αλληλομορφικών συχνοτήτων μεταξύ της παρούσας και της μελέτης διεθνούς βιβλιογραφίας σε κατοίκους του Τορόντο, Ευρωπαϊκής καταγωγής²⁵, για τον πολυμορφισμό

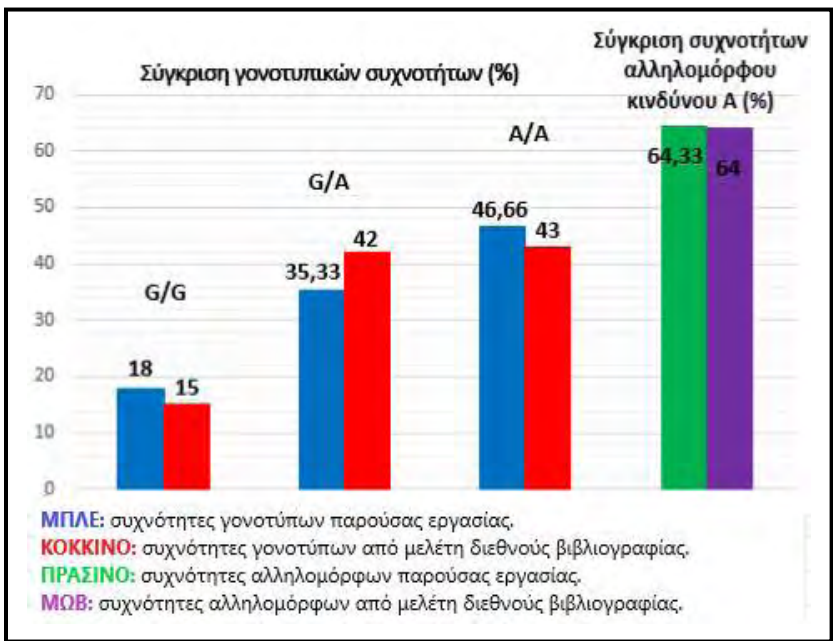
Στο παραπάνω διάγραμμα 4, παρατηρείται πως οι αλληλομορφικές και γονοτυπικές συχνότητες των ομόζυγων για το αλληλόμορφο κινδύνου (C/C), του πολυμορφισμού του MC4R γονιδίου, μεταξύ της συγκεκριμένης μελέτης και της αναφερόμενης μελέτης της διεθνούς

βιβλιογραφίας κυμαίνονται στις ίδιες τιμές χωρίς καμία σημαντική διαφορά. Ωστόσο, οι γονοτυπικές συχνότητες των ομόζυγων (T/T) για το προστατευτικό αλληλόμορφο και των ετερόζυγων (T/C) παρουσιάζουν αξιοσημείωτες διαφορές. Επειδή, τόσο τα άτομα της παρούσας εργασίας όσο και τα άτομα της μελέτης διεθνούς βιβλιογραφίας²⁵ είναι Ευρωπαϊκής καταγωγής, ίσως οι διαφορές που αναφέρθηκαν να οφείλονται σε εθνοτικές διαφορές. Προκειμένου να διεξαχθεί ένα πιο ολοκληρωμένο αποτέλεσμα, θα ήταν χρήσιμο στο μέλλον να πραγματοποιηθεί μελέτη με μεγαλύτερο αριθμό ατόμων Ελληνικής καταγωγής, ώστε να εκτιμηθεί αν υπάρχει κάποια ιδιαιτερότητα στον Ελληνικό πληθυσμό, για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό.

Επιπλέον, ο ρυθμιστής ανάπτυξης νευρώνων (NEGR1), είναι μια πρωτεΐνη που στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο NEGR1 και εκφράζεται έντονα στον τοξοειδή πυρήνα (ARC) και στον κοιλιακό υποθάλαμο (VMH) συμβάλλοντας στη ρύθμιση του ενεργειακού ισοζυγίου. Ο rs2815752 NEGR1 SNP είναι η αντικατάσταση της γουανίνης (G: προστατευτικό αλληλόμορφο) σε αδενίνη (A: αλληλόμορφο κινδύνου).

Μελέτες συσχέτισης γονιδιώματος (GWAS) αποδεικνύουν πως ο πολυμορφισμός rs2815752 του γονιδίου NEGR1 σχετίζεται επίσης με αυξημένο BMI και μεγαλύτερο κίνδυνο για εμφάνιση παχυσαρκίας σε Καυκάσιο πληθυσμό. Πιο συγκεκριμένα, σε μελέτη Καυκάσιου πληθυσμού 499 ατόμων από τα οποία τα 326 ήταν γυναίκες και τα 173 άνδρες, ως ομόζυγοι (G/G) για το προστατευτικό αλληλόμορφο ήταν περίπου το 15% του συνόλου, ετερόζυγοι (G/A) και ομόζυγοι (A/A) για το αλληλόμορφο κινδύνου ήταν αντίστοιχα 42% και 43% και η συσχόνητα του αλληλόμορφου κινδύνου (G) κυμαίνεται στο 64%³⁰. Από τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει πως ούτε σε αυτόν τον πολυμορφισμό παρουσιάζονται διαφορές μεταξύ γυναικών και ανδρών καθώς η συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού είναι 61,96% και 59,24% αντίστοιχα.

Στη συνέχεια, στο διάγραμμα 5 και στο πίνακα 22, παρατίθενται συνολικά τα αποτελέσματα του πολυμορφισμού του NEGR1 με σκοπό την ταχύτερη και ευκολότερη σύγκριση των δεδομένων της παρούσας και της μελέτης της διεθνούς βιβλιογραφίας.



Γυναίκες		Άνδρες	
Πείραμα	Άρθρο	Πείραμα	Άρθρο
68,3	61,96	60,3	59,24

Διάγραμμα 5: Σύγκριση γονοτυπικών και αλληλομορφικών συχνοτήτων μεταξύ της παρούσας και της μελέτης διεθνούς βιβλιογραφίας σε Καυκάσιο πληθυσμό³⁰, για τον πολυμορφισμό του NEGR1.

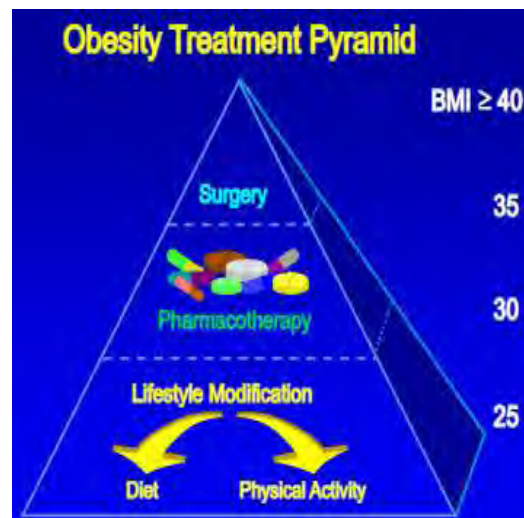
Πίνακας 22: Σύγκριση ανδρών και γυναικών για το NEGR1.

Όσον αφορά, τον πολυμορφισμό του NEGR1 γονιδίου, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 5, παρατηρείται πως μεταξύ των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας και της μελέτης διεθνούς βιβλιογραφίας σε Καυκάσιο πληθυσμό³⁰, δεν υπάρχουν διαφορές στις συχνότητες των αλληλομόρφων όπως επίσης και στις γονοτυπικές συχνότητες με εξαίρεση, τις συχνότητες που αφορούν τους ετερόζυγους για το αλληλόμορφο κινδύνου (G/A). Θα ήταν χρήσιμο μελλοντικά, να πραγματοποιηθεί μια πιο εκτεταμένη μελέτη με μεγαλύτερο αριθμητικό ατόμων Ελληνικής καταγωγής έτσι ώστε, να διαπιστωθεί αν υπάρχει κάποια ιδιομορφία στον Ελληνικό πληθυσμό σε σχέση με τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό.

Συνοψίζοντας, και για τους 3 πολυμορφισμούς χρειάζεται να πραγματοποιηθεί μια πιο ολοκληρωμένη μελέτη με περισσότερα άτομα Ελληνικής καταγωγής. Ειδικότερα, για κάθε άτομο εκτός από γονοτύπηση των συγκεκριμένων πολυμορφισμών χρειάζεται να γίνει και συσχέτιση των γονοτύπων με το BMI κάθε ατόμου έτσι ώστε, σε περίπτωση ενός υπέρβαρου ή παχύσαρκου ατόμου να εκτιμηθεί αν αυτή η αύξηση βάρους οφείλεται όντως σε γενετικούς παράγοντες που αφορούν γενετικές παραλλαγές.

Όπως έχει προαναφερθεί, η παχυσαρκία που αποδίδεται σε μετάλλαξη ενός νουκλεοτιδίου εκτιμάται ότι αντιπροσωπεύει μικρό ποσοστό των περιπτώσεων, μόνο το 5%-10%, ωστόσο, η γονοτύπηση τέτοιων πολυμορφισμών που έχουν αποδειχθεί πως είναι άμεσα συσχιζόμενοι με αυξημένο Δείκτη Μάζας Σώματος και εμφάνιση παχυσαρκίας, μπορεί να συμβάλει στην πρόληψη και αντιμετώπισή της.

Αναλυτικότερα, προκειμένου να επιλεγεί ο καλύτερος και πιο ορθός τρόπος αντιμετώπισης κατά της παχυσαρκίας, η γονοτύπηση του ατόμου, για συγκεκριμένους πολυμορφισμούς χρειάζεται να συνοδεύεται και από την κατηγοριοποίησή του σε ελλιποβαρή, σε φυσιολογικού βάρους, σε υπέρβαρο ή σε παχύσαρκο ανάλογα με το BMI του (βλέπε παράγραφο 1.2). Η γνώση του BMI κάθε ατόμου είναι απαραίτητη, διότι ανάλογα με το Δείκτη Μάζας Σώματος προτείνεται η αντίστοιχη



Εικόνα 15: Πυραμίδα-οδηγός για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας, κατά της παχυσαρκίας, ανάλογα με το BMI.

θεραπεία και ο καταλληλότερος τρόπος αντιμετώπισης, στοχεύοντας στην «εξατομικευμένη θεραπεία». Η απώλεια βάρους επιτυγχάνεται με σωστή διατροφή, με την απαραίτητη φυσική δραστηριότητα, με φαρμακολογική θεραπεία είτε με βαριατρική χειρουργική επέμβαση. Στην εικόνα 15, φαίνεται η θεραπεία που προτείνεται ανάλογα με το BMI. Δηλαδή, σε υπέρβαρα άτομα με BMI=25-29,9 kg/m² προτείνεται ως θεραπεία η σωστή διατροφή και η σωματική δραστηριότητα, για άτομα με παχυσαρκία 1^{ου} βαθμού και BMI=30-34,9 kg/m² προτείνεται η φαρμακευτική θεραπεία και σε άτομα με παχυσαρκία 2^{ου} βαθμού και νοσηρή παχυσαρκία, με BMI μεγαλύτερο από 35 kg/m² συνιστανται η χειρουργική επέμβαση^{40,41}.

Επομένως, δεδομένου πως η παχυσαρκία αποτελεί παγκόσμιο πρόβλημα υγείας, η γονοτύπηση συγκεκριμένων πολυμορφισμών, άμεσα σχετιζόμενων με την παχυσαρκία και αυξημένο BMI, διαφορετικών ωστόσο, μεταξύ των λαών και των πληθυσμών, σύμφωνα με μελέτες της διεθνούς βιβλιογραφίας, αποτελεί μια πρόταση που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως λύση για την εξακρίβωση της ύπαρξης γενετικής προδιάθεσης για παχυσαρκία, όσον αφορά τη μετάλλαξη ενός νουκλεοτιδίου ως μια από τις αιτίες για εμφάνιση παχυσαρκίας. Η γονοτύπηση, αυτών των πολυμορφισμών μπορεί να αξιοποιηθεί τόσο από άτομα φυσιολογικού βάρους, καθώς μπορεί να δοθεί απάντηση για το αν υπάρχει γενετική προδιάθεση για παχυσαρκία και να μεριμνίσουν για την σωστή πρόληψη, τόσο και από υπέρβαρα ή παχύσαρκα άτομα προκειμένου να προταθεί η καταλληλότερη εξατομικευμένη θεραπεία για μείωση βάρους και αποφυγή όλων των δυσμενών επιπτώσεων του υπερβολικού βάρους και της παχυσαρκίας.

Η εξατομικευμένη θεραπεία, ύστερα από γονοτύπηση των 3 υπό μελέτη πολυμορφισμών, θα έχει ως απώτερο σκοπό το άτομο να μπορεί να αισθάνεται κορεσμό ώστε να μην ξεφεύγει είτε στην κατανάλωση τεράστιων ποσοτήτων τροφής, είτε στην ασταμάτητη και συνεχόμενη κατανάλωση τροφής που τελικά θα τον οδηγήσει σε εμφάνιση παχυσαρκίας και αυξημένο BMI.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας αποτέλεσαν 3 μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί των γονιδίων FTO, MC4R και NEGR1 που είναι άμεσα συνδεδεμένοι με αυξημένο κίνδυνο για εκδήλωση παχυσαρκίας και αυξημένο Δείκτη Μάζας Σωματος, ιδιαίτερα σε Καυκάσιο, Ευρωπαϊκό, Αφροαμερικάνικο και ορισμένους πληθυσμούς Ασιατικής προέλευσης.

Μεταξύ των 150 δειγμάτων Ελληνικού πληθυσμού προέκυψαν και για τους 3 υπό μελέτη πολυμορφισμούς τα ακόλουθα αποτελέσματα. Για τον πολυμορφισμό rs9939609 του FTO βρέθηκε πως το 34,66% του συνόλου είναι ομόζυγοι για το προστατευτικό αλληλόμορφο, 43,33% ετερόζυγοι και 22% ομόζυγοι για το αλληλόμορφο κινδύνου με ολική συχνότητα εμφάνισης 43,66%. Επίσης για τον πολυμορφισμό rs17782313 του MC4R γονοτυπήθηκε το 50,66% ως ομόζυγοι για το προστατευτικό αλληλόμορφο, 44% ετερόζυγοι και 5% ομόζυγοι για το αλληλόμορφο κινδύνου με ολική συχνότητα εμφάνισης 27,33%. Τέλος, για τον πολυμορφισμό rs2815752 NEGR1 ανιχνεύθηκε το 18% του συνόλου ως ομόζυγοι για το προστατευτικό αλληλόμορφο, 35,33% ετερόζυγοι και 46,66% ομόζυγοι για το αλληλόμορφο κινδύνου με ολική συχνότητα εμφάνισης 64,33%. Τα παραπάνω αποτελέσματα, όσον αφορά τις αλληλομορφικές συχνότητες και των 3 προαναφερόμενων πολυμορφισμών, αλλά και τις γονοτυπικές συχνότητες του πολυμορφισμού του FTO γονιδίου, συνάδουν με τα αποτελέσματα μελετών διεθνούς βιβλιογραφίας σε Ευρωπαϊκό πληθυσμό. Ωστόσο, οι γονοτυπικές συχνότητες των ομόζυγων για το προστατευτικό αλληλόμορφο (T/T), των ετερόζυγων (T/C) του πολυμορφισμού MC4R καθώς επίσης, και των ετερόζυγων (G/A) του πολυμορφισμού του NEGR1 γονιδίου, παρουσιάζουν διαφορές με μελέτες της διεθνούς βιβλιογραφίας σε Καυκάσιο πληθυσμό και αυτό ίσως να οφείλεται σε εθνοτικές διαφορές μεταξύ των ατόμων Ευρωπαϊκής καταγωγής. Για το λόγο αυτό, μελλοντικά χρειάζεται να διεξαχθεί πιο ολοκληρωμένη μελέτη, με μεγαλύτερο αριθμό ατόμων Ελληνικής καταγωγής, προκειμένου να εκτιμηθεί αν υπάρχει κάποια ιδιαιτερότητα στον Ελληνικό πληθυσμό, σε σχέση με του πολυμορφισμούς των γονιδίων MC4R και NEGR1.

Ανακεφαλαιώνοντας, η παχυσαρκία αποτελεί ένα παγκόσμιο πρόβλημα υγείας και ορίζεται ως η περίσσεια συσσώρευση σωματικού λίπους που οφείλεται σε περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες, οι οποίοι διαταράσσουν το ενεργειακό ισοζύγιο, με δυσμενείς επιπτώσεις για την υγεία. Όσον αφορά τους γενετικούς παράγοντες, έχει εντοπιστεί πλήθος γονιδίων που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για παχυσαρκία και αυξημένο Δείκτη Μάζας Σώματος. Η καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους τα γονίδια αυτά οδηγούν σε αυξημένη όρεξη θα διευκολύνει την ανίχνευση προδιάθεσης παχυσαρκίας και θα συμβάλλει σημαντικά στην ανάπτυξη εξατομικευμένης θεραπείας με σκοπό την επιτυχή απώλεια και διατήρηση σωματικού βάρους. Συγκεκριμένα, η γονοτύπηση των 3 υπό μελέτη πολυμορφισμών, μελλοντικά μπορεί να αξιοποιηθεί στην ανάπτυξη εξατομικευμένης θεραπείας με στόχο το άτομο να αισθάνεται κορεσμό και να μην καταφεύγει στην κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων τροφών ή στη συνεχή και αδιάκοπη κατανάλωση τροφών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Martin, K. A., Mani, M. V., & Mani, A. (2015). New targets to treat obesity and the metabolic syndrome. *European journal of pharmacology*, 763(Pt A), 64-74.
2. Mägi, R., Manning, S., Yousseif, A., Pucci, A., Santini, F., Karra, E., Querci, G., Pelosini, C., McCarthy, M. I., Lindgren, C. M., ... Batterham, R. L. (2013). Contribution of 32 GWAS-identified common variants to severe obesity in European adults referred for bariatric surgery. *PloS one*, 8(8), e70735. doi:10.1371/journal.pone.0070735
3. Hurt, R. T., Kulisek, C., Buchanan, L. A., & McClave, S. A. (2010). The obesity epidemic: challenges, health initiatives, and implications for gastroenterologists. *Gastroenterology & hepatology*, 6(12), 780-92.
4. Allott, E. H., & Hursting, S. D. (2015). Obesity and cancer: mechanistic insights from transdisciplinary studies. *Endocrine-related cancer*, 22(6), R365-86.
5. Tzima, N., Pitsavos, C., Panagiotakos, D. B., Skoumas, J., Zampelas, A., Chrysohoou, C., & Stefanadis, C. (2007). Mediterranean diet and insulin sensitivity, lipid profile and blood pressure levels, in overweight and obese people; the Attica study. *Lipids in health and disease*, 6, 22. doi:10.1186/1476-511X-6-22
6. Άννα Πατσοπούλου, Η διερεύνηση του επιπολασμού της εφηβικής παχυσαρκίας στην Ελλάδα: μια βιβλιογραφική ανασκόπηση, *Ελληνικό Περιοδικό της Νοσηλευτικής Επιστήμης* 2015, 8(2): 15-24
7. Fruh S. M. (2017). Obesity: Risk factors, complications, and strategies for sustainable long-term weight management. *Journal of the American Association of Nurse Practitioners*, 29(S1), S3-S14.
8. Steven E. Kahn, Rebecca L. Hull & Kristina M. Utzschneider, Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes, *Nature* 444, 840-846, 2007.
9. Ε. Λιόρδα, Φ. Ηλιάδης, Τ. Διδάγγελος, Α. Χατζητόλιος, Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 και άσκηση, *Ελληνικά Διαβητολογικά Χρονικά* 27, 4: 210-220, 2014.

10. Al-Goblan, A. S., Al-Alfi, M. A., & Khan, M. Z. (2014). Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy*, 7, 587-91. doi:10.2147/DMSO.S67400
11. Romieu, I., Dossus, L., Barquera, S., Blotière, H. M., Franks, P. W., Gunter, M., Hwalla, N., Hursting, S. D., Leitzmann, M., Margetts, B., Nishida, C., Potischman, N., Seidell, J., Stepien, M., Wang, Y., Westterp, K., Winichagoon, P., Wiseman, M., Willett, W. C., IARC working group on Energy Balance and Obesity (2017). Energy balance and obesity: what are the main drivers?. *Cancer causes & control : CCC*, 28(3), 247-258.
12. Manore, M. M., Larson-Meyer, D. E., Lindsay, A. R., Hongu, N., & Houtkooper, L. (2017). Dynamic Energy Balance: An Integrated Framework for Discussing Diet and Physical Activity in Obesity Prevention-Is it More than Eating Less and Exercising More?. *Nutrients*, 9(8), 905. doi:10.3390/nu9080905
13. Aiceles, V. & da Fonte Ramos, C. (2016). A link between hypothyroidism, obesity and male reproduction. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 25(1), pp. 5-13. Retrieved 30 Jan. 2019, from doi:10.1515/hmbci-2015-0054
14. Sanyal, D., & Raychaudhuri, M. (2016). Hypothyroidism and obesity: An intriguing link. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, 20(4), 554-7.
15. Korbonits M (ed): *Obesity and Metabolism*. Front Horm Res. Basel, Karger, 2008, vol 36, pp 37-60. doi: 10.1159/000115336
16. Suzanne B. Cassidy MD, Stuart Schwartz PhD, Jennifer L. Miller MD & Daniel J. Driscoll MD, PhD, Prader-Willi syndrome, *Genetics in Medicine* volume 14, pages 10–26 (2012).
17. Bjørbaek C, Hollenberg AN., *Leptin and melanocortin signaling in the hypothalamus.*, *Vitam Horm.* 2002;65:281-311
18. Vega J, A, Salazar G, Hodgson M, I, Cataldo L, R, Valladares M, Obregón A, M, Santos J, L: *Melanocortin-4 Receptor Gene Var*
19. Fawcett, K. A., & Barroso, I. (2010). The genetics of obesity: FTO leads the way. *Trends in genetics : TIG*, 26(6), 266-74.
20. J Wardle, C Llewellyn, S Sanderson & R Plomin, *The FTO gene and measured food intake in children*, *International Journal of Obesity* volume 33, pages 42–45 (2009).
21. Boissel, S., Reish, O., Proulx, K., Kawagoe-Takaki, H., Sedgwick, B., Yeo, G. S., Meyre, D., Golzio, C., Molinari, F., Kadhon, N., Etchevers, H. C., Saudek, V., Farooqi, I. S., Froguel, P., Lindahl, T., O'Rahilly, S., Munnich, A., ... Colleaux, L. (2009). Loss-of-function mutation in the dioxygenase-encoding FTO gene causes severe growth retardation and multiple malformations. *American journal of human genetics*, 85(1), 106-11.
22. Mittal, B., Srivastava, A., & Srivastava, N. (2016). Is fat mass & obesity-associated (FTO) gene master regulator of obesity ?. *The Indian journal of medical research*, 143(3), 264-6.
23. Uyghjh Christian Dina, David Meyre, Sophie Gallina, Emmanuelle Durand, Antje Körner, Peter Jacobson, Lena M S Carlsson, Wieland Kiess, Vincent Vatin, Cecile Lecoeur, Jérôme Delplanque, Emmanuel Vaillant, François Pattou, Juan Ruiz, Jacques Weill, Claire Levy-Marchal, Fritz Horber, Natascha Potoczna, Serge Hercberg, Catherine Le Stunff, Pierre Bougnères, Peter Kovacs, Michel Marre, Beverley Balkau, Stéphane Cauchi, Jean-

- Claude Chèvre & Philippe Froguel, Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity, *Nature Genetics* volume 39, pages 724–726 (2007).
24. Qi Q, Kilpeläinen TO, Downer MK, et al. FTO genetic variants, dietary intake and body mass index: insights from 177,330 individuals. *Hum Mol Genet.* 2014;23(25):6961-72.
 25. Yilmaz, Z., Davis, C., Loxton, N. J., Kaplan, A. S., Levitan, R. D., Carter, J. C., & Kennedy, J. L. (2014). Association between MC4R rs17782313 polymorphism and overeating behaviors. *International journal of obesity* (2005), 39(1), 114-20.
 26. Horstmann, A., Kovacs, P., Kabisch, S., Boettcher, Y., Schloegl, H., Tönjes, A., Stumvoll, M., Pleger, B., ... Villringer, A. (2013). Common genetic variation near MC4R has a sex-specific impact on human brain structure and eating behavior. *PloS one*, 8(9), e74362. doi:10.1371/journal.pone.0074362
 27. Boender, A. J., van Gestel, M. A., Garner, K. M., Luijendijk, M. C., & Adan, R. A. (2014). The obesity-associated gene *Negr1* regulates aspects of energy balance in rat hypothalamic areas. *Physiological reports*, 2(7), e12083. doi:10.14814/phy2.12083
 28. article{Kim2017TheNO, title={The new obesity-associated protein, neuronal growth regulator 1 (NEGR1), is implicated in Niemann-Pick disease Type C (NPC2)-mediated cholesterol trafficking.}, author={Hyejin Kim and Younghwa Chun and Lihua Che and Jeongbeom Kim and Sungjoong Lee and Soojin Lee}, journal={Biochemical and biophysical research communications}, year={2017}, volume={482 4}, pages={1367-1374}}
 29. Jarick, I., Vogel, C. I., Scherag, S., Schäfer, H., Hebebrand, J., Hinney, A., & Scherag, A. (2010). Novel common copy number variation for early onset extreme obesity on chromosome 11q11 identified by a genome-wide analysis. *Human molecular genetics*, 20(4), 840-52.
 30. Dennis, E. L., Jahanshad, N., Braskie, M. N., Warstadt, N. M., Hibar, D. P., Kohannim, O., Nir, T. M., McMahon, K. L., de Zubicaray, G. I., Montgomery, G. W., Martin, N. G., Toga, A. W., Wright, M. J., ... Thompson, P. M. (2014). Obesity gene *NEGR1* associated with white matter integrity in healthy young adults. *NeuroImage*, 102 Pt 2(0 2), 548-57.
 31. Δ.Παλαιολόγου, Ε. Κατσαρέλη και Γ. Παπανικολάου, Εργαστηριακές ασκήσεις γενετικής του ανθρώπου, Απομόνωση DNA, Κεφάλαιο 5, 103-115, 2015
 32. Δ.Παλαιολόγου, Ε. Κατσαρέλη και Γ. Παπανικολάου, Εργαστηριακές ασκήσεις γενετικής του ανθρώπου, Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, Κεφάλαιο 7, 129-152, 2015
 33. Δ.Παλαιολόγου, Ε. Κατσαρέλη και Γ. Παπανικολάου, Ηλεκτροφόρηση DNA , Κεφάλαιο 8, 153-165, 2015.
 34. Song, Y., You, N. C., Hsu, Y. H., Howard, B. V., Langer, R. D., Manson, J. E., Nathan, L., Niu, T., F Tinker, L., ... Liu, S. (2008). FTO polymorphisms are associated with obesity but not diabetes risk in postmenopausal women. *Obesity* (Silver Spring, Md.), 16(11), 2472-80.
 35. Indira Baručija-Özçoban, Adna Ašić, Larisa Bešić, Sabina Halilović, Damir Marjanović, Serkan Dogan, A Decade of the Common FTO rs9939609 Polymorphism: A Systematic Review, 42(2):147-158 · September 2018

36. Baturin AK, Sorokina Elu, Pogozheva AV, Peskova EV, Makurina ON, Tutel'ian VA., [Regional features of obesity-associated gene polymorphism (rs9939609 FTO gene and gene Trp64Arg ADRB3) in Russian population], Vopr Pitan. 2014;83(2):35-41
37. Evans, D. S., Calton, M. A., Kim, M. J., Kwok, P. Y., Miljkovic, I., Harris, T., Koster, A., Liu, Y., Tranah, G. J., Ahituv, N., Hsueh, W. C., ... Vaisse, C. (2014). Genetic association study of adiposity and melanocortin-4 receptor (MC4R) common variants: replication and functional characterization of non-coding regions. PloS one, 9(5), e96805. doi:10.1371/journal.pone.0096805
38. Xi, B., Chandak, G. R., Shen, Y., Wang, Q., & Zhou, D. (2012). Association between common polymorphism near the MC4R gene and obesity risk: a systematic review and meta-analysis. PloS one, 7(9), e45731.
39. Park, S., Daily, J. W., Zhang, X., Jin, H. S., Lee, H. J., & Lee, Y. H. (2016). Interactions with the MC4R rs17782313 variant, mental stress and energy intake and the risk of obesity in Genome Epidemiology Study. Nutrition & metabolism, 13, 38. doi:10.1186/s12986-016-0096-8
40. Sun, X., Li, P., Yang, X., Li, W., Qiu, X., & Zhu, S. (2017). From genetics and epigenetics to the future of precision treatment for obesity. Gastroenterology report, 5(4), 266-270.
41. Hinney, A., Herrfurth, N., Schonnop, L. et al. Bundesgesundheitsbl. (2015) 58: 154

LINKS

42. <https://www.who.int/topics/obesity/en/>
43. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
44. <https://www.who.int/nutrition/topics/obesity/en/>
45. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
46. http://www.who.int/cardiovascular_diseases/about_cvd/en/
47. [http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
48. <https://www.onmed.gr/ygeia/story/352864/h-paxysarkia-paragontas-kindynoy-gia-11-morfes-karkinoy>
49. https://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood_why/en/
50. <https://www.mednutrition.gr/portal/efarmoges/leksiko-diatrofis/15202-energeiako-isozygio>
51. <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/release23/en/>
52. <https://www.mednutrition.gr/portal/ygeia/alles-pathiseis/4544-therapeia-me-kortizoni-ti-prepei-na-troo>
53. <https://www.nhsinform.scot/tests-and-treatments/medicines-and-medical-aids/types-of-medicine/corticosteroids>
54. https://www.google.gr/search?q=prader+willi+syndrome&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiDyKSjg_eAhWEYIAKHTiBBnwQ_AUIDigB&biw=1242&bih=597#imgrc=akNNNxQpJ9MVjM
55. https://www.google.gr/search?biw=1242&bih=597&tbm=isch&sa=1&ei=e2gKXMfBI5D_WwQKXrSQAQ&q=leptin+melanocortine+pathway+yypothalamoys&oq=leptin+melanoco

[rtine+pathway+yothalamoys&gs_l=img.3...773764.798297..798915...8.0..0.133.4275.37j8.....0....1j2..gswizimg.....0..0j0i67j0i10i24j0i24j0i10j0i30j0i19.OF9hGWzx3MA#imgrc=dARHL-NmqQV4SM](#)

56. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/FTO#location>
57. <https://www.snpedia.com/index.php/Rs9939609>
58. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MC4R#location>
59. <https://www.snpedia.com/index.php/Rs17782313>