

T.C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI BİLİM DALI BAŐKANLIĐI

**TÜRK TOPLUMUNDA OBEZ HASTALARDA MELANOKORTİN-4 RESEPTÖR
(MC4R) GEN MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

T.C. YÜKSEKÖĐRETİM BAKANLIĞI
DOKÜMAN YAYIN KURUMU

UZMANLIK TEZİ

T 91810

Mehmet MERGEN
Tbp. Kd. Yzb.

Ankara - 2000

ÖNSÖZ

Bu tez konusu Gülhane Askeri Tıp Akademisi İç Hastalıkları Bilim Dalı Başkanlığının Mart 1998 tarihli emriyle verilmiş ve çalışılmaya başlanmıştır.

İnsan obezitesinin gelişmesinde genetik faktörlerin potansiyel katkısı obezitenin beş monogenik formunun tanımlanmasıyla ispatlanmıştır. Bunlar leptin, leptin reseptörü, prokonvertaz 1, proopiomelanokortin ve melanokortin-4 reseptör (MC4R) genleridir. MC4R hariç bu genlerdeki mutasyonlar endokrin anormalliklerle birlikte obezitenin sendromik formlarına neden olurlar. MC4R gen mutasyonları diğer tek gen mutasyonlarından daha sık (%3-4) obeziteye neden olmaktadır. Memeli enerji homeostazının kontrolünde santral melanokortinerjik yolağın önemi obez insan ve fareler üzerinde yapılan son genetik çalışmalarda belirtilmiştir. Yürütölmüş olan bu çalışmada Türk toplumunda otozomal dominant tipte geçiş gösteren obeziteye neden olabilen MC4R geninde ortaya çıkan mutasyonların belirlenmesi amaçlanmıştır.

Konunun belirlenmesi, çalışmanın yürütölmesi ve ortaya çıkan sorunların aşılmasında yardım ve katkılarını esirgemeyen tez yönetmenim Doç. Tbp. Alb. Metin ÖZATA'ya teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Uzmanlık eğitimim boyunca yetişmeme katkılarından olan dolayı sayın hocalarım, İç Hastalıkları Bilim Dalı Başkanı Prof. Tbp. Kd. Alb. Fikri KOCABALKAN'a, Prof. Tbp.Kd. Alb. Nurettin ÖZCAN'a, Prof. Tbp. Kd. Alb. İsmail Hakkı KOÇAR'a, Prof. Tbp. Kd. Alb. Selahattin ERİKÇİ'ye, Prof. Tbp. Kd. Alb. İ. Çağlayan ÖZDEMİR'e, Doç. Tbp. Kd. Alb. Tahir ÜNAL'a, Doç. Tbp. Alb. Yavuz BAYKAL'a, Doç. Tbp. Yb. Kenan SAĞLAM'a, Doç.Tbp. Kd. Bnb. Bayram KOÇ'a, Doç. Tbp. Kd. Bnb. Fatih BULUCU'ya, Doç. Tbp. Bnb. Refik MAS'a ve Yrd. Doç. Tbp. Bnb. Çağatay ÖKTENLİ'ye teşekkürlerimi arz ederim.

İç Hastalıkları uzmanlık eğitimim süresince birikimleri ve deneyimlerinden yararlanmaya çalıştığım tüm İç Hastalıkları Anabilim Dalı personeli adına İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Tbp. Tuğg. Atilla YALÇIN'a teşekkürlerimi arz ederim.

Araştırmayı proje halinde kabul ederek gerekli malzemenin temin edilmesini sağladıkları için GATA Araştırma ve Geliştirme Merkezine şükranlarımı sunarım.

Araştırmanın deneysel çalışmalarını titizlikle ve başarıyla gerçekleştiren başta eşim Dr. Hatice MERGEN olmak üzere Hacettepe Üniversitesi Moleküler Biyoloji Bölümü ğretim yeleri sayın Prof. Dr. Cihan NER ve Prof. Dr. Reyhan ÖNER'e sonsuz teşekkürlerimi bildiririm.

Vakaların toplanması sırasında katkı ve yardımları için Aile Hek. Uz. Dr. Yusuf ÜSTÜ'ye, uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalıştığım tüm uzmanlık ğrencisi arkadaşlarıma ve klinik personeline teşekkür ederim.

Uzun ve yorucu bir eğitim süresi içinde her zaman bana destek olan ve fedakarlık gösteren eşime minnettar olduğumu belirtirim.

Mehmet MERGEN

Tbp. Kd. Yzb.



İÇİNDEKİLER

GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
OBEZİTE	3
1. Obezite risk faktörleri	3
2. Obezite gelişiminde rol oynayan çevresel faktörler	4
3. Obezitenin ölçülmesi.....	5
4. Obezitenin prevalansı.....	6
ENERJİ DENGESİNİ KONTROL EDEN SANTRAL MEKANİZMALAR.....	6
MELANOKORTİN-4 RESEPTÖR (MC4R) GEN YAPISI.....	7
TEK GEN MUTASYONLARI.....	9
GEREÇ VE YÖNTEM.....	11
BULGULAR.....	22
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	29
ÖZET.....	32
SUMMARY.....	33
KAYNAKLAR.....	34

GİRİŞ

Obezite olması gerekenden fazla miktarda yağ dokusunun vücutta biriktiği durumdur. Vücudun normal bir komponenti ve insan fizyolojisi bakımından olmazsa olmaz (sine qua non) özelliğine sahip olan yağ dokusunun normalden fazla miktarda depolanması bir hastalık halinin varlığını belirler.

Obezite tüm dünyada sıklığı epidemi şeklinde artan ve tedavisi zor olan kronik bir hastalıktır. Polijenik zeminde multifaktöriyel bir bozukluktur. Obezite vücudun enerji dengesini sağlayan adaptasyon mekanizmaları ile çevresel ortam arasında süregelen bir etkileşim sonucu ortaya çıkmaktadır.

Obezite büyük bir oranda genetik bir hastalık olmakla beraber, çevresel faktörlerin de önemini gözardı etmemek gerekir. Obezite gelişimini etkileyen sosyal, kültürel, kognitif ve biyolojik çevresel faktörler vardır. Obezitenin günümüzdeki tedavisi büyük oranda bu çevresel faktörlerin düzeltilmesine dayanmaktadır.

Obeziteye neden olan genetik biyolojik mekanizmalar henüz bilinmemektedir. Son yıllarda yeme davranışı fizyolojisi ve termogenez üzerinde yapılan çalışmalarda önemli ipuçları elde edilmiştir. Obezitenin altında yatan asıl biyolojik bozukluk olasılıkla hipotalamustaki enerji dengesini düzenleyen mekanizmalarda saklanmıştır. Obezite tedavisinde gerçek başarı bunlar ortaya çıkarılıp düzeltilince sağlanabilir. Önümüzdeki on yıl bu alanda önemli gelişmelere tanıklık edecektir.

Bugün kabul edilen görüşe göre obezitedeki genetik ağırlıklı patogenetik faktörün yeme davranışı ve miktarını ve/veya termogenezi belirleyen merkezi sinir sistemindeki mekanizmalar ve/veya bunları yöneten yağ dokusundan beyne gelen sinyallerde bozukluk olduğu yönündedir. Bu sinyaller beyindeki anabolik veya katabolik yolları harekete geçirerek enerji homeostazını ve yağ dokusu miktarını belirler.

Obezitede rol oynayan genlerin tanımlanmasında yavaş olmasına rağmen önemli gelişmeler kaydedilmektedir. Son zamanlarda tanımlanan gen varyantları obezitenin fenotipik ekspresyonunu modifiye eder gözükmemektedir. Obezitenin genetik temelini anlaşılmaması, hastalığın fizyopatolojisinin daha iyi kavranmasını sağlayacaktır. Obezitenin anlaşılmaması konusunda kaydedilen gelişmeler daha iyi primer önleme stratejilerinin ve dünya nüfusunun % 10'undan fazlasını etkileyen bir durum ile mücadelede etkin terapötik ajanların geliştirilmesini sağlayacaktır.

Günümüzde obeziteye neden olan genetik faktörler üzerine yapılan çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır ve obeziteye neden olduğu düşünülen birçok gende mutasyon taramaları yapılmaktadır. Bu genlerden bazıları leptin, leptin reseptörü, prokonvertaz 1, proopiomelanokortindir. Bir tanesi de Melanokortin-4 Reseptör geni (MC4R) olarak bulunmuştur ve bu genin özellikle otozomal dominant ailesel geçişli obeziteden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda MC4R gen mutasyonu 20 obez hastada bulunmuştur. Ancak Türk toplumunda böyle bir çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışma kapsamında Türk toplumunda otozomal dominant ailesel geçişli obezitede Melanokortin-4 Reseptör gen mutasyonlarının Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP) ve DNA dizi analizi yöntemleri kullanılarak taranması amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında bir hastada kodon 274'de A→G nokta mutasyonu, bir hastada kodon 103'te ve 25 hastada kodon 169'da yer alan iki farklı polimorfizm tesbit edilmiştir.



GENEL BİLGİLER

Obezite kelimesi Latince ob - den dolayı, esum : yemiş olmak, yani obezite yemekten dolayı anlamındadır. Morbid obezitedeki morbid terimi ise hastalıklı veya ölümcül anlamına gelir.

Obezite vücutta aşırı miktarda yağ depolanmasını ifade eden, özellikle batılı toplumlar olmak üzere tüm dünyada epidemi şeklinde oldukça yaygın ve hızla artan bir beslenme problemidir. Hipertansiyon, dislipidemi, diabetes mellitus ve kardiyovasküler hastalıklar (1) gibi komplikasyonlara yol açtığından dramatik olarak morbidite riski ve mortalite artışına (2) neden olan obezite 21. yüzyıl için başlıca halk sağlığı sorunlarından biri olmuştur (3,4). Obezite genetik ve çevresel faktörlerin etkileşmesiyle ortaya çıkan multifaktöriyel ve kronik bir hastalık kompleksidir (5,6).

İnsanoğlunun geçmişi kıtlık dönemleri ile doludur. Bu dönemlerde genetik olarak yağ depolama yani şişmanlama eğilimi fazla olan insanlar hayatta kalmışlar, zayıflar ise varlıklarını sürdürememişlerdir. Atalarının o zamanlar için avantaj olan, şişmanlama eğilimi yaratan genlerini taşıyan insanlardan oluşan günümüz toplumu bol ve kalori içeriği fazla yiyecekler ve hareketsiz bir yaşamla birlikte obezite, tip 2 diabetes mellitus, dislipidemi, hipertansiyon ve bunların getirdiği ateroskleroz (Sendrom X) gibi çok önemli sağlık sorunlarıyla karşı karşıya kalmıştır ve bu durum "thrifty genotype" hipotezi olarak adlandırılmıştır.

Obezite Risk Faktörleri

1. Fiziksel aktivitede azalma
2. Doğum sayısı
3. Sigarayı bırakma
4. Alkol
5. Sosyokültürel etkenler
6. Evlilik
7. Beslenme alışkanlıkları
8. Yaş
9. Cinsiyet (kadın)
10. Irksal faktörler
11. Eğitim düzeyi

Obesite Gelişiminde Rol Oynayan Çevresel Faktörler (3)

- | | |
|-----------------------------------|--|
| 1. Sosyal faktörler: | Sosyal yapıdaki değişimler
Ekonomik değişimler ve piyasa ekonomisi
Şehirleşme
Sosyoekonomik durum |
| 2. Bilişsel (kognitif) Faktörler: | Diyet kısıtlaması
Vücut ağırlığına dikkat etme |
| 3. Kültürel Faktörler: | Yemek seçimi
Sağlığa dikkat etme düzeyi |
| 4. Biyolojik Faktörler: | Diyetin yağ içeriği
Enerji alımı
Azalmış fiziksel aktivite |

Obezitenin Ölçülmesi

Ortalama ağırlığa sahip erişkin erkeklerde vücut yağının oranı % 15-20 arasındadır. Kadınlarda bu oran daha yüksektir (%25-30). Bireyler arasındaki ağırlık farklılığı kısmen vücut yağına bağlı olduğu için normal ağırlıktaki kişiler ile fazla kilolu olan kişiler arasındaki ayrımın yapılmasında vücut ağırlığının veya boy ve kilo ölçümünü esas alan indekslerin (vücut kitle indeksi gibi) kullanılmasına karşı çıkılabilmektedir. Vücut kitle indeksinin (VKI) kullanılmasının uygun olmadığı durumlara örnek olarak vücut geliştiren genç bir erkek ile orta yaşlı obez bir kadının özdeş VKI'leri verilebilir. Ancak bu uç örneklerle karşı VKI ile vücut yağ arasında güçlü bir bağlantı olduğu bilinmektedir.

Vücut Yağını ve Dağılımını Ölçme Yöntemleri

1. Vücut kitle indeksi
2. Deri kıvrımları kalınlığı
3. Bel ve kalça çevresi ölçümleri
4. Ultrason
5. Vücut yoğunluğu (immersiyon ve pletismograf)
6. Ağır su (hidrometri)

7. Potasyum izotopu
8. Tüm vücut elektriksel iletkenliği
9. Biyoelektrik impedans
10. Yağda çözünen gaz
11. Absorbsiyometre (DEXA)
12. Bilgisayarlı tomografi
13. Manyetik rezonans
14. Nötron aktivasyonu

Obezite fazla kilolu olmakla eş anlamlı değildir. Kemik, kas ve yağ ağırlıklarının toplamı vücut ağırlığını verir. $\text{Boy (cm)} - 100 = \text{ideal ağırlık}$, Broca İndeksi adı ile bilinen eski bir formüldür. 170 cm boyunda bir insan bu formüle göre $170-100=70$ kg olmalıdır. Ancak 170 cm boyunda bir sporcu 80 kg olduğu halde obez olarak nitelendirilmeyebilir. Çünkü ağırlığı normalin üzerinde olmasına rağmen yağ kitlesi normalin üzerinde değildir. Dolayısıyla bu kişi obez değildir. Tersine 170 cm boyunda 70 kg ağırlığında olup yağ kitlesi normalin çok üzerinde olan kişilerde vardır. Birinci örnekte kas kemik kitlesi artmış obez olmayan kilosu ağır bir kişi vardır, ikinci örnekte ise kas kemik kitlesi az yağ dokusu artmış kilosu normalden fazla olmamasına karşın obez olan bir kişi vardır.

Salt boy ve ağırlık ölçümü ile yapılan değerlendirmenin yetersiz kaldığı görülmektedir. Bu durumda önerilen ölçü vücut kitle indeksidir. Vücut kitle indeksi kilogram cinsinden vücut ağırlığının metre cinsinden boyun karesine bölünmesi ($\text{Ağırlık (kg)} / \text{boy (m}^2\text{)} = \text{VKİ}$) ile hesaplanır. Örneğin boyu 1.70 m ağırlığı 70 kg olan bir kişinin VKİ $70 / (1.70)^2 = 24.2$ dir. VKİ'nin vücut yağ kitlesi ile korelasyonunun iyi olduğu gösterilmiştir. Bununla beraber çocuklar, gebeler, ödemi olan hastalar, çok kısa boylu kişiler ve bazı özel durumlar (normal ağırlıkta metabolik olarak obez) dışında uygun bir obezite belirleme yöntemidir. Vücut kitle indeksi arttıkça eşlik eden hastalık riskinin arttığı görülmektedir.

Erişkin Kişide VKİ Değerlendirmesi (7)

Sınıflama	VKİ	Eşlik Eden Morbidite Riski
Zayıf	<18.5	Düşük
Normal	18.5-24.9	Orta
Fazla kilolu	>25	
Pre-obez	25-29.9	Orta derecede artmış
Obez 1	30-34.9	Artmış
Obez 2	35-39.9	Ağır
Obez 3	>40	Çok ağır

(Morbid obez)

Obezite prevalansı : VKİ > 30 olanlar obez, 26 - 30 arasında olanlar fazla kilolu kabul edilerek yapılan araştırmalarda WHO' ya göre (1997) dünyada ortalama obezite sıklığı % 25 civarındadır. Burada % 10' luk kısım VKİ > 39' un üzerinde olanlara yani morbid obezlere aittir. Toplumların % 25' i normal kilolu fakat obeziteye genetik eğilimli, % 25' i fazla kilolu, % 25' i ise normal kişilerden oluşmaktadır. Türkiye' de 1999 yılında Türkiye Endokrinoloji Derneği, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi ve T.C. Sağlık Bakanlığı' nın 24.788 vaka üzerinde yaptığı obezite çalışması sonucunda Türk toplumunda kadınlarda obezite prevalansı %30, fazla kilolu (preobez) prevalansı %27, toplam % 57 ve erkeklerde obezite prevalansı %13, fazla kilolu prevalansı %19, toplam %32 olarak bulunmuştur.

Normal kiloda metabolik olarak obez üzerinde durulması gereken bir tanımdır. Bu kişilerin anamnezlerinde akrabaları arasında obez, diyabetik, aterosklerotik, hipertansif kişilerin olduğu bildirilir. Bel – kalça oranı > 0,8–0,9 üzerindedir. Metabolik tetkiklerinde hiperinsülinemi, insülin direnci, hipertrigliseridemi, HDL-kolesterol düşüklüğü belirtilerinden bir yada birkaçını gösterirler.

Enerji Dengesini Kontrol Eden Santral Mekanizmalar

Beyindeki değişik nöronal yollarda üretilen ve salınan çeşitli nöropeptidler ve monoaminler gıda alımını ve termogenezi etkileyerek enerji dengesini değiştirebilirler. İnsan obezitesinin etyopatogenetik sebebinin bu basamaktaki bugün bilinen veya henüz bilinmeyen mediyatörlerdeki yapısal veya fonksiyonel bozukluk veya bozukluklar olduğu sanılmaktadır. Santral mekanizmalar anabolik yani vücut yağ dokusunu artırıcı veya

bunun tersi kataboliktir. Anabolik sistemler gıda alımını artırır, ayrıca enerji harcanmasını azaltabilir ve çevresel ortamı değiştirerek alınan gıdanın asimilasyonu ve depolanmasını etkileyebilir. Katabolik sistemler ise gıda alımını azaltır, ayrıca depolanmış yağın mobilizasyonunu lipoliz veya termogenez yoluyla artırabilir. Genel kural olarak sempatik sinir sisteminin uyarılması katabolik, parasempatik sistemin uyarılması ise anabolik etki gösterir.

Melanokortinler

Melanokortin sistemi hipotalamusta yağ dokusundan gelen leptin mesajını enerji dengesine yansıtan önemli bir yoldur. Melanokortinler alfa Melanosit Stimüle edici Hormon (α MSH) ve kortikotropin ile aynı aileden gelen peptidler olup onlar gibi proopiomelanokortin (POMC) öncülünden ayrılır. POMC de nöropeptid Y (NPY) gibi sadece nükleus arkuatusta üretilir ve bu nöronlar akson uçlarından α MSH salgılarlar. α MSH'da postsinaptik membrandaki melanokortin reseptörlerine bağlanır ve aktif hale gelmelerini sağlar.

5 melanokortin reseptörü arasında beyinde bulunanlar MC3 ve MC4 reseptörleridir (8). Özellikle MC4 reseptörünün enerji dengesinin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı bulunmuştur. Genetik olarak MC4 geni yok edilmiş farelerde hiperfaji ve obezite görülmesi (9), bunun intraventriküler MC4 agonistleri ile düzeltilmesi (10) melanokortin sisteminin enerji dengesi düzenlenmesindeki önemini kanıtlamaktadır.

Melanokortin reseptörler G protein çifti reseptörleri süper ailesine aittir (11). Şimdiye kadar 5 melanokortin reseptör alt tipi tanımlanmıştır. Bunlar fizyolojik fonksiyonlarda ve doku dağılımlarında farklılıklar gösterir. MC1R pigmentasyonu düzenleyen melanositlerde ifade edilir (12). MC2R adrenal kortekste ifade edilir, ACTH bağlar ve glukokortikoneogenezde yer alır (8). MC5R periferel dokularda ifade edilir ve ekzokrin bez fonksiyonunun düzenlenmesine katkıda bulunur(13). MC3R ve MC4R'nin her ikisinde primer olarak beyinde hipotalamik paraventriküler nükleusta ifade edilir (11) ve ağırlık homeostazının santral düzenlenmesindeki rolleri yoğun bir araştırma konusu olmuştur.

MC4R Gen Yapısı

İnsan MC4R geni 1671 nükleotid uzunluğundadır ve 999 nükleotid uzunluğunda olan tek bir ekson içerir. MC4R geni kromozom 18q22'de yerleşim gösterir (11,14).

Melanokortin-4 reseptör (MC4R) geni bir G-protein olan ve transmembran reseptörü ile birleşen melanokortin reseptör proteinini kodlamaktadır (11). Özellikle hipotalamusta çok yüksek oranda ifade edilmektedir ve vücut ağırlığının kontrolünde çok önemli rol oynamaktadır. Homozigot MC4R eksikliği olan farelerde hiperinsülinemi ile birlikte gözlenen morbid obezite ortaya çıkmaktadır. Heterozigot fareler de bu mutasyonlardan etkilenmekte ve orta dereceli bir fenotip kazanmaktadır (8). Hipotalamusta ifade edilen MC4R, proopiomelanokortinden köken alan bir nöropeptid olan α MSH tarafından aktive edilir (10) ve agouti ilişkili protein (ART-AGRP) ile antagonist çalışır (15). Bu metabolik yolun leptinin santral etkisiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir (16).

MC4R'ün enerji dengesindeki kritik rolü ilk defa Huszar ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir ve MC4R geninde mutasyon olan farelerle yaptıkları çalışmada hiperfaji, obezite ve hiperinsülinemi ortaya çıkmıştır (8). 1998'de Vaisse ve arkadaşları ile Yeo ve arkadaşları tarafından tek ailelerde MC4R' de heterozigot frameshift mutasyonun erken başlangıçlı aşırı obezitenin dominant kalıtılmasına neden olduğu rapor edilmiştir (17,18). Bu raporları takiben Gu ve arkadaşları (19) 140 obez hastada 2 missens mutasyon, Hinney ve arkadaşları (20) ise 306 obez çocukta 9 missens ve 2 nonsense mutasyon bildirmiştir. Birden fazla çalışmada ise birkaç konservatif aminoasit değişiklikleri rapor edilmiştir. Rastgele aminoasit değişikliklerine karşın patojenik mutasyonların belirsizliklerine rağmen bugüne kadar dünya çapında en az 20 vakada MC4R geninde patojenik mutasyon bildirilmiştir (21). Bu da MC4R genini insan obezitesinin tanımlanan en yaygın monogenik formu yapmaktadır. MC4R'ün vücut ağırlığının düzenlenmesindeki önemi MC4R eksikliği olan homozigot farelerin obez fenotipinin görülmesiyle açık olarak ispatlanmıştır. Heterozigot MC4R farelerde kilo artışı orta derecededir ve dişiler erkeklere göre daha fazla etkilenmiştir.

Vaisse ve arkadaşları heterozigot MC4R mutasyonlarının obeziteye % 4 gibi yüksek bir sıklıkla neden olduğunu tespit etmişlerdir (22). Bu mutasyonları taşıyan vakaların fenotiplerinin incelenmesiyle bu hastaların sendromik olmayan yaygın obezite formunda olduğunu ispatlamışlardır. Diğer tek gen mutasyonları ise resesif olarak genellikle multipl endokrin anormallikler ile birlikte sendromik obeziteye neden olmaktadır. POMC geninde nadir resesif mutasyonlar α MSH üretimini etkileyerek MC4R'ün aktivasyonunu etkileyerek erken başlangıçlı obeziteye neden olabilir (23,24).

Melanokortin sisteminin doğal antagonistleri bulunmaktadır. Bunlardan ilk bulunanı agoutidir. Agouti aslında derideki kıl folliküllerinden sentezlenir ve parakrin etkiyle α MSH' un deri MC1R'deki etkisini antagonize eder (25). Farelerde agouti uygulanması tüy renginde ani bir açılmaya neden olur. Çünkü melanin üretimi α MSH'un MC1R'e bağlanması ile stimüle edilir. Agouti ayrıca beyinde MC4R'ü de antagonize eder. Agoutinin üretimini arttıran bir gen düzenlenmesinde MC1R ve MC4R antagonizmasına bağlı sarı obez fareler ortaya çıkmıştır (25). Başka bir melanokortin reseptör antagonisti ise agouti ile önemli benzerlik gösteren Agouti related protein (AgRP) dir. Agoutiden farklı olarak AgRP sadece beyinde bulunur ve sadece MC3R ve MC4R'ü antagonize eder, deride etkisi yoktur (16). AgRP ifadesi artırılmış farelerde obezite görülmekte, ancak deri renginde değişiklik bulunmamaktadır (16). AgRP büyük oranda NPY ile nükleus arkuatusta aynı hücrelerde ifade edilmekte ve leptin tarafından negatif feed back ile kontrol edilmektedir (26). Nükleus arkuatusta özel bir nöron tipi (NPY/AgRP nöronu) leptinden aldığı negatif sinyale hem NPY ile hiperfaji yapmakta hem de AgRP ile MC4R'lerini antagonize ederek çok güçlü kilo aldırıcı etki göstermektedir.

Tek Gen Mutasyonları

İnsan obezitesinin gelişiminde genetik faktörlerin potansiyel katkısı obezitenin beş monogenik formunun tanımlanmasıyla ispatlanmıştır. Bunlar leptin (LEP) (27,28), leptin reseptörü (LEPR) (29), prokonvertaz 1 (PCSK 1) (30), proopiomelanokortin (POMC) (23) ve melanokortin 4 reseptör (MC4R) (17,18,19,20) gen mutasyonlarıdır. Literatürde yer alan tek gen mutasyonlarına ait bilgiler aşağıda verilmektedir (Tablo 1)

Tablo 1. Obeziteye neden olan tek gen mutasyonları

Gen	Mutasyon	Yerleşim	Ailesel Durum	Cinsiyet	Yaş	Ağırlık (kg)	BMI (kg/m ²)	Referans	
LEPR	G→A ekson 16	1p31	P	K	19	166	65.5	Clement 98	
			S	K	13	159	71.5	Clement 98	
			S	K	19	133	52.5	Clement 98	
POMC	G7013T ve C 7133 ekson3	2p23	P	K	3	30	NA	Krude 98	
	C3804A ekson2	2p23	P	E	7	50	NA	Krude 98	
PCSK1	Gly483Arg A→C ⁺ intron5	5q15-q21	P	K	3	36	NA	Jackson 97	
LEP	G398delta kodon 133	7q31	P	K	8	86	45.8	Montague 97	
			C	E	2	29	36.6	Montague 97	
	C→T kodon 105 ekson 3		C	K	6		32.5	Strobel 98	
			P	E	22		55.8	Strobel 98	
			A	K	34		46.9	Strobel 98	
			C	K	30	130	54.9	Ozata 99	
MC4R	CTCT nt 631-634 kodon 211	18q21.3	P	E	4	32	28	Yeo 98	
			Fa	E	30	139	41	Yeo 98	
			P	K	20		42.1	Hinney 99	
			M	K	43		37.6	Hinney 99	
	GATT insersiyon nt 732 kodon 246		M	K	58		51	Vaisse 98	
			P	K	35		57	Vaisse 98	
			N	E	24		33	Vaisse 98	
			N	K	11		30	Vaisse 98	
			S	K	34		50	Vaisse 98	
			P1	K	10		31.1	Hinney 99	
	C105A (Tyr35X)		P2	K	17		45.9	Hinney 99	
			M1	K	31		48.2	Hinney 99	
			M2	K	36		38.6	Hinney 99	

P = hasta; Fa = baba; M = anne; S = kız kardeş; B = erkek kardeş; N = yeğen; C = kuzen A = hala; K = kadın ; E = erkek ; NA = çalışılmadı

GEREÇ VE YÖNTEM

İncelenen Örneklerin Toplanması

Tez çalışmasında gereç olarak 40 bireyden alınan yaklaşık 5 ml periferik kan örnekleri kullanılmıştır. Kan örnekleri Gülhane Askeri Tıp Akademisi İç Hastalıkları B.D. polikliniğine başvuran bireylerden alınmıştır. MC4R gen mutasyonları familial otozomal dominant geçiş gösterdiği için kan örneği alınan her bireyin ailelerindeki obezite durumu da gözönüne alınmış ve bu bilgiler kayda geçirilmiştir. Toplanan örneklerin mutasyon taraması Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümünde yapılmıştır.

Çalışılan 40 vakanın hepsinde çocukluklarından beri obezite anamnezi mevcuttu ve anne ve/veya babalarında ve/veya ailenin diğer fertlerinde obezite hikayesi vardı. Ailesinde ve birinci derece akrabalarında obez bulunmayan ve çocukluğunda obezite anamnezi vermeyen kişiler çalışmaya alınmadı.

40 vakanın 35'i kadın (22-87 yaş) ve 5'i erkek (18-63 yaş) idi. VKİ kadınlarda 31-57 kg/m² ve erkeklerde 32-57 kg/m² olarak hesaplandı.

Kandan Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için, Yen ve arkadaşları tarafından geliştirilen DNA izolasyon yöntemi değiştirilerek kullanıldı (31). EDTA'lı tüplere alınan yaklaşık 4-5 ml kan örneklerine aşağıda belirtilen DNA izolasyon yöntemi uygulandı.

- 1- 400 µl kan 1.5 ml'lik ependorf tüpü içine alındı.
- 2- Örnek Tris- EDTA (TE) tamponu ile 1ml'ye tamamlandı.
TE Tamponu: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA , P_H= 8.3
- 3- Tüpler 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek örneklerin yıkanması sağlandı.
- 4- Üstteki süpernatant atıldı ve üzerine tekrar TE Tamponu ilave edildi. Bu işlem 3 kez tekrar edildi.
- 5- Üstteki süpernatant atıldıktan sonra pellet üzerine lizis tamponu ilave edildi. Son hacmi 500 µl'ye tamamlamak için üzerine TE Tamponu ilave edildi.

Lizis Tamponu

%10 Sodyum dodesil sülfat	80 µl
1M NaCl	90 µl
10mg/ml Proteinaz K	5 µl

- 6- Tüpler 56°C de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- 7- Tüplerin üzerine eşit hacimde fenol-kloroform (1:1) ilave edildi.
- 8- Tüpler 2500 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
- 9- Üstteki berrak kısım temiz bir ependorf tüpe aktarıldı.
- 10- Üzerine DNA'nın çökmesi için saf etil alkol ilave edildi.
- 11- Saf etil alkol uzaklaştırıldıktan sonra tüplere %70'lik etil alkol ilave edildi.
- 11- Tüplerdeki alkol uzaklaştırıldıktan sonra DNA yaklaşık 200 µl steril distile suda çözüldü.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle MC4R Gen Bölgesinin Çoğaltılması

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), dizisi bilinen bir DNA bölgesinin, uygun primerler yardımıyla in-vitro olarak çoğaltılmasını sağlayan tekniktir. Bu teknikte ısıya dayanıklı bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'tan elde edilen Taq polimeraz enzimi kullanılır. Taq polimeraz enzim proteini 85.00 dalton molekül ağırlığında olup, polimerizasyon aktivitesini 72 °C'da gösterir ve 94 °C'de inkübe edildikten sonra bile fonksiyonel kalır.

Polimeraz enzimleri aktivite için serbest magnezyum iyonlarına gereksinim gösterir. Başarılı bir amplifikasyon için en uygun magnezyum derişiminin bilinmesi gerekir. Her dNTP'den 0.2 mM kullanıldığında optimum magnezyum derişimi 1.5-4 mM arasındadır ve bu değerler 0.7-3.2 mM serbest magnezyum derişimine karşılık gelir.

Başlangıçtaki DNA molekülü sayısı, PCR'nin kaç döngü uygulanacağını belirler. 1-100 kopya DNA molekülü ile başlanıyorsa 30-45 döngü, 1000-10000 ile başlanıyorsa 20-30 döngü yeterlidir. Bu sayede çok küçük miktardaki genomik DNA'nın yaklaşık olarak 10⁶ kere çoğaltılması sağlanır.

PCR tekniğinin temelinde 3 basamak bulunmaktadır:

- 1- Yüksek sıcaklık ile DNA zicirinin denatüre edilmesi,
- 2- Primerlerin kalıp DNA üzerinde bulunan kendilerine komplementer bölgeler ile birleşmesi,
- 3- Isıya dayanıklı Taq polimeraz varlığında DNA'nın polimerizasyonu.

MC4R gen bölgesinin amplifikasyonu bazı modifikasyonlarla birlikte yukarıda temel mekanizması açıklanmış olan Saiki ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntemle göre yapılmıştır (32). MC4R geni amplifikasyonu için kullanılan primer setleri şu şekildedir:

MC4R	5' - AATAACTGAGACGACTCCCTGAC - 3'
MC4R	5' - CAGAAGTACAATATTCAGGTAGGG - 3'
MC4F1	5' - TGAGACGACTCCCTGACCCAG - 3'
MC4F2	5' - CATCACCTATTAAACAGTACAG - 3'
MC4F3	5' - AGGCTTCACATTAAGAGGATTG - 3'
MC4R1	5' - TACAATATTCAGGTAGGGTAAGA - 3'
MC4R2	5' - TTGGCGGATGGCACCAGTGC - 3'
MC4R3	5' - CACTGTGAACTCTGTGCATC - 3'

Uygun primer setlerinin eldesinden sonra bu bölgeler önce çift zincir olarak DNA dizi analizi için kullanıldı. Çift zincir mtDNA amplifikasyonu için primer setlerinin oranları reaksiyon boyunca eşmolar olacak şekilde hesaplandı.

1 Örnek İçin Hazırlanan Reaksiyon Karışımı

10 x reaksiyon tampon	10 µl
25 mM dNTP karışımı	1 µl
Direkt primer	1 µl (100 pmol)
Revers primer	1 µl (100 pmol)
sd H ₂ O	87 µl
Taq DNA polimeraz	0.5 µl (2.5 u)

10x reaksiyon tamponu: 10 mM Tris HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, % 0.1 Tritonx100, 0.2 mg/ml BSA veya jelatin

Örnekler DNA çift zincirinin açılması, olası proteaz kontaminasyonun önlenmesi ve ekzonükleaz aktivitesinin ortadan kaldırılması için ilk olarak 95°C'de 4 dakika ısıtıldı. Daha sonra sıcaklık enzimin ilave edilebileceği 85°C'ye düşürüldü ve her tüpe 2.5 U Taq polimeraz ilave edildi. Polimerizasyon işlemi DNA Thermal Cycler'da aşağıdaki programa göre gerçekleştirildi.

Program ;	94°C	50"
	56°C	40"
	72°C	1' olmak üzere 30 döngüden oluşmaktadır.

Son döngüden sonra yarım kalan reaksiyonların tamamlanması için 72°C'de 7 dakika tutuldu.

Reaksiyon sonucunda amplifikasyon ürünleri 1 x TBE (Tris-Borik asit-EDTA) tamponu içinde bulunan %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve etidyum bromür ile boyanarak UV lambası altında oluşan PCR fragmentleri incelendi.

10x TBE Tamponu: 10 mM Tris, 1 mM Borik asit, 20 mM EDTA, P_H= 8.3

Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP) Analizi

SSCP tekniği günümüzde pek çok hastalığa neden olan mutasyonların ve bilinmeyen mutasyonların bulunması için bir ön tarama metodu olarak kullanılmaktadır. Bu metod ilk kez Kanazawa ve arkadaşları tarafından E.coli F₁ATPaz'ı üzerindeki çalışmalarda kullanılmıştır (33).

Metodun prensibi tek zincirli nükleik asitlerin belirli koşullar altında çözelti içerisinde baz kompozisyonuna bağlı olarak sekonder bir yapı kazanmalarına dayanır. Tek bir nükleotid değişikliği ile bu yapı değişebilir. Bu da nondenatüre edici koşullar altında elektroforetik mobilitayı değiştirir. Sekonder yapıya zincir içi baz eşleşmesi neden olur. Tek zincirli DNA molekülünün katlanmış yapısının nasıl olacağı ve bu sekonder yapının elektroforetik mobilitayı nasıl etkileyeceği önceden tahmin edilemez ve bu konuda teorik bir yaklaşım da mevcut değildir (34). Deneyimsel olarak hassasiyetin tahmin edilmesi zordur. Çünkü hassasiyet yalnızca mutasyonla değil mutasyonla interaksiyona giren komşu nükleotid dizilerine de bağlıdır. SSCP ile 150-200 nükleotid uzunluğundaki PCR ürünleri incelenebilir. SSCP'de başlangıçta radyoaktivite kullanılmasına karşın son zamanlarda yaygın olarak nonradyoaktif metod kullanılmaktadır. Ayrıca rutin ve hızlı uygulamalar için nonradyoaktif SSCP'nin geliştirilmesi zorunluluk olmuştur. SSCP'nin gümüş boyama ile yapılması uygundur (35).

SSCP için örnekler 100-500 baz çifti büyüklüğünde PCR ürünleri olabilir. İyi sonuçlar elde etmek için PCR ürünü yüksek oranda özgül ve temiz olmalıdır. Jelin yüzdesi kullanılan örneğin moleküler büyüklüğüne bağlı olmakla birlikte genel olarak şu oranlar tercih edilir:

500 bç :	% 7.0 (w/v)
400 bç :	% 7.5 (w/v)
300 bç :	% 7.75 (w/v)
200 bç :	% 8.0 (w/v)
100 bç :	% 9.0 (w/v)

% 7.5'luk bir jel dökmek için aşağıdaki oranlar kullanılır:

% 40'lık akrilamid solüsyonu	14.0 ml
(49:1 yada 19:1 oranında hazırlanır)	
10XTBE	7.5 ml
APS(%'10 luk)	300 µl
TEMED	90 µl

Distile su ile 75 ml'ye tamamlanarak süzülür ve havası alınır. Hava kabarcığı oluşturmada iki camın arasına jel karışımı dökülür. Polimerleşmesi için bir saat beklenir.

Örneklerin Yüklenmesi

Örnekler yüklenmeden önce jel boşken bir saat elektroforez uygulanır. PCR ürünü eşit hacim formamidli yükleme çözeltisi ile karıştırılır ve 94 °C de 5 dakika denatüre edilerek hemen buz üzerine alınır. PCR ürünün yoğunluğuna göre 5-10 µl alınarak poliakrilamid jele yüklenir. Gece boyu soğuk odada (4°C) 10 mA sabit akımda yaklaşık olarak 16 saat yürütülür. Soğuk oda kullanılamazsa jele % 5-10 gliserol eklenmesi daha iyi sonuç alınmasını sağlar. Gümüş boyama yapılarak bantlar değerlendirilir.

Poliakrilamid Elektroforezi için camların hazırlanması

1. Camlar % 75'lik etanol ile silinir.
2. Kısa cama 1 ml yapıştırıcı solüsyon dökülür. Cama tamamen yayılarak jelin homojen bir şekilde kısa cama yapışması sağlanır.
3. kısa ve uzun camlar tekrar % 75'lik alkolle 3'er kez silinir.
4. jelin iki yanına ve alt kısmına spacerlar yerleştirilerek iyice sıkıştırılır.

5. Jel karışımı hazırlanan iki camın arasına dökülerek tarak yerleştirilir ve yaklaşık iki saat polimerize olması için beklenir.

Poliakrilamid Jel Elektroforezi

İki cam arasına dökülen jel polimerleştikten sonra kristalleşmiş üre partikülleri temizlenerek dikey elektroforez cihazına yerleştirilir. Alt ve üst haznelere 1XTBE tamponu doldurulur. Bir saat kadar ön elektroforez işleminden sonra örnekler jelin kuyucuklarına uygulanır. Örnekler 550 voltta yaklaşık olarak 6 saat yürütülür.

Gümüş nitrat ile boyama

1. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel elektroforez aletinden çıkarılarak % 10'luk asetik asit çözeltisi ile 30 dakika çalkalanarak fikse edilir.
2. Fiksasyon işlemi tamamlandıktan sonra jel iki kez 5 dakika ar ile distile su ile yıkanır.
3. % 0.1'lik gümüş nitrat çözeltisi içinde 30 dakika çalkalanarak boyanır. Gümüş nitrat eklenmeden hemen önce içerisine % 0.056'lık formaldehit eklenir.
4. Gümüş nitrat dökülerek kısa bir yıkama işleminden sonra % 3'lük sodyum karbonat, % 0.056'lık formaldehit ve 40 µg/ml sodyum tiyosülfat çözeltisi ile jel developpe edilerek bantların gözle görülür hale gelmesi sağlanır.
5. % 10'luk asetik asit ile boyama işlemi durdurulur.

DNA Dizi Analizi Yöntemi ile Mutasyonların Saptanması

Bu tez çalışmasında MC4R gen bölgesindeki mutasyonlarının saptanması amacıyla Sanger'in geliştirdiği DNA dizi analizi metodundan yararlanılmıştır (36). Sanger metodu, DNA zincirinin enzimatik sentezine ve sentezin, 2',3'-dideoksinükleotidtrifosfatlar (ddNTP'ler) kullanılarak, özgül bazlarda sonlandırılması temeline dayanır. Sanger'e ikinci kez nobel ödülü kazandıran bu teknikte;

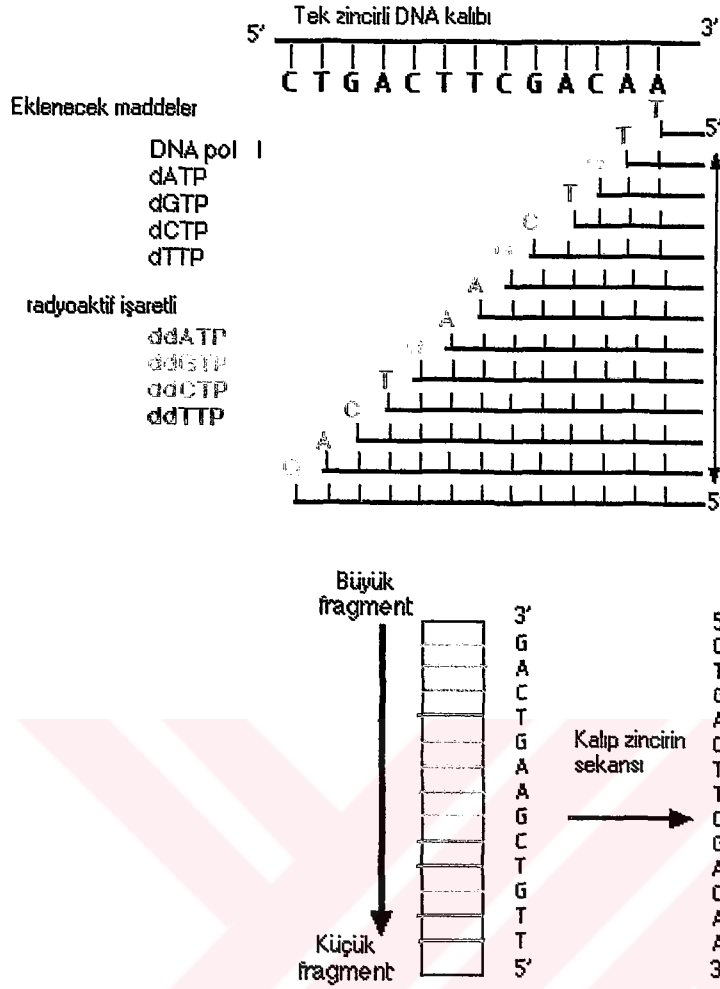
1. DNA polimeraz tarafından uzama için özgül primer kullanılır.
2. Zincir uzaması özgül bir bazda sonlandırılır.
3. Tek zincirli DNA'lar, poliakrilamid jel kullanılarak tek bir nükleotid uzunluğuna dayalı olarak birbirinden ayrılır.

Zincir sonlanmasını sağlayan 2',3' ddNTP'ler, deoksiribozun 3' konumundaki hidroksil grubunun eksikliği ile, dNTP'lerden ayrılırlar. ddNTP'ler DNA polimeraz tarafından uzatılan DNA zincirlerindeki 5'-fosfat

gruplarına birleştirilebilirler. Bununla birlikte, 3' hidroksil grubunun yokluğu, dNTP ile başlanan fosfodiester bağı kurmayı önler. Bu durumda, DNA zincirinin uzaması gerçekleşmez. Böylece DNA sentezi için reaksiyon karışımında dört genel dNTP ile bir ddNTP'nin az miktarı bulunduğu bunlar arasında zincir uzaması ve özgül zincir sonlanması rekabeti olur. Dört ayrı enzimatik reaksiyonda 4 farklı ddNTP'nin kullanılmasıyla kalıp zincirin her A, C, G yada T pozisyonlarında sonlandırılan oligonükleotid grupları meydana getirilir.

Reaksiyon sonunda, oluşan ürünleri görüntülemek radyoaktif izotoplar aracılığıyla DNA molekülü işaretlenir. Bu izotoplar ^{32}P ve ^{35}S 'tir. Bu izotopları yapıya sokmak için günümüzde en çok kullanılan iki yol vardır: Bunlardan birincisi, bu izotopları yapısında γ pozisyonunda taşıyan nükleotidler kullanarak primerin 5' ucundan işaretlenmesidir. Burada, reaksiyon polinükleotid kinaz aktivitesi ile katalizlenir. 5' ucu defosforile olan primer oligonükleotid, kinaz aktivitesi ile fosforile olurken, fosfat vericisi olarak $\gamma^{32}\text{dNTP}$ kullanılır. Böylelikle primer işaretlenmiş olur. Dizi analizi reaksiyonunda bu primer sentez kolunun yapısına katılacağından analiz ürünlerinin hepsi direkt olarak işaretli fosfat grubunu taşıyacaktır. İkinci yol ise, α pozisyonundan işaretli dNTP'ler kullanarak katılma yolu ile işaretlemedir. Burada enzim, dizi analizi için kullanılan DNA polimeraz enziminin kendisidir. Yöntem için önce, kalıp DNA ile primer oligonükleotid bir araya getirilir (annealing). Ardından ortama sentez için gereken tuzlarla birlikte dört dNTP de eklenir. Bu nükleotitlerden biri, α pozisyonundan işaretlenmiş olan $\alpha^{32}\text{P}$ dNTP yada $\alpha^{35}\text{S}$ dNTP'dir. Sonra ortama enzim eklenir ve oda ısısında kısa süren bir inkübasyonla işaretli nükleotidin yapıya katılması sağlanır. İşaretlemeden sonra dizi analizi için gereken zincir sonlanması reaksiyonlarına geçilir.

Ürünlerin ayrıştırılması, yüksek rezolüsyonlu denatüre edici poliakrilamid jel elektroforezinde gerçekleştirilir. Elektroforez mobilitesi en yüksek olan bant primere yada başka deyişle radyoaktif elemente en yakın yerde sonlanmış, en küçük DNA fragmentidir ve hangi ddNTP ile oluşturulmuş ise işaretten yada primerden sonra gelen ilk baz odur. Mobilitesi ilk banta en yakın olan ikinci bant ise ikinci bazı gösterir. Böylelikle aşağıdan yukarıya doğru mobilitesi giderek düşen bantların hangi ddNTP ile oluşturuldukları belirlenir ve 5'→3' yönüne doğru olan baz dizilimi belirlenmiş olur (Şekil 1).



Şekil.1 DNA dizi analizi yönteminin şematik olarak gösterilmesi

MC4R gen bölgesinin DNA dizi analizi yoluyla incelenmesi amacıyla kalıp olarak tek zincirli amplifikasyon ürünleri kullanılmıştır. Bu amaçla United Biochemical Cooperation firmasının Version 2.0 Sequencing reaksiyon kiti (USB 70170) kullanılmıştır.

Dizi Analizi Reaksiyonu

PCR ve Dizi Analizi reaksiyonları 500 µl 'lık mikrosantrifüj tüplerinde gerçekleştirildi.

PCR ürünü reaksiyon başlangıcında aşağıda belirtilen şekilde enzimatik işleminden geçirildi.

PCR ürünü	5 µl
Eksonükleaz I	1 µl
Shrimp alkale fosfataz	1 µl
Toplam	7 µl

- 1- PCR aletinde 37°C'de 15 dakika inkübe edildi.
- 2- Eksonükleaz ve SAP, 80°C'de 15 dakika inkübe edilerek inaktive edildi.
- 3- Bu işlem devam ederken terminasyon karışımı için tüpler hazırlanıp isimlendirildi, 2.5µl terminasyon karışımı (ddNTPler) ilave edildi.

4- Primer ve kalıbın birleşmesi

Enzimatik işlemden geçirilmiş PCR ürünü DNA	7 µl
Primer	1 µl
H ₂ O	2 µl
Toplam	10 µl

100°C'de 2-3 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüpler buzlu suya alınarak burada 5 dakika tutuldu. Bu süre sonunda tüpler buza alındı.

5- İşaretleme Reaksiyonu

DNA- Primer karışımı	10 µl
T7 Sequenase reaksiyon tamponu	2 µl
0.1 M DTT	1 µl
1:5 seyreltilmiş işaretleme karışımı	2 µl
[³⁵ S] dATP	0.5 µl (5µCi)
T7 Sequenase v2.0 DNA polimeraz	2 µl
Toplam	17.5 µl

Karışım oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.

6- Sonlandırma reaksiyonu;

Her terminasyon tüpüne işaretleme-reaksiyon karışımından 3.5µl ilave edildi, karıştırıldı ve 37°C'de 5-10 dakika terminasyon reaksiyonunun gerçekleşmesi için inkübasyona devam edildi.

7- Reaksiyon 4µl durdurma solusyonu ilave edilerek durduruldu.

8- Örnekler jele yüklenmeden önce 80°C'de 2-3 dakika denatüre edildi. Jelin kuyucuklarına sırasıyla A, C, G, T tüplerinden 4.5 µl örnek yüklenerek koşturuldu.

Sekans Jelinin Hazırlanması

Elektroforez için % 6'lık poliakrilamid jel kullanıldı.

100 ml toplam hacimde ;

üre 45 g

akrilamid 5.7 g

bisakrilamid 0.3 g

10 x TBE 10 ml olacak şekilde hazırlandı. Manyetik karıştırıcıda iyice çözünmesi sağlandıktan sonra havası alındı. 600 µl %10'luk amonyum per sülfat ve 45 µl TEMED ilave edilerek iki cam levha arasına 0.4mm kalınlığında döküldü. Jelin polimerize olabilmesi için oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.

DNA Sekans Elektroforezi

Polimerizasyon işlemi tamamlandığında ortamdaki kristalleşmiş üre parçacıkları temizlenerek CONSORT DNA sekans elektroforezi aletine yerleştirildi. Elektroforez tamponu olarak 1 x TBE kullanıldı. Sisteme 70 watt, 1800 volt ve 50mA elektrik akımı verilerek 15-30 dakika ön elektroforez uygulandı. Bu uygulama tamamlandıktan sonra jele DNA sekans reaksiyonlarından 4.5 µl yüklenerek yukarıdaki elektrik akımı koşulları uygulanarak örnekler 2.5-3 saat koşturuldu.

Otoradyografi

Elektroforez bitiminde jel, asetik asit-metanol karışımında 10 dakika bekletildi. Whatman 3MM kromatografi kağıdı üzerine alınarak jel kurutucuda 30-45dakika kurutuldu. Jel kuruduktan sonra X ışınına duyarlı KODAK X-OMAT filmle kaplandı. 1-2 gün boyu oda sıcaklığında karanlık odada tutularak otoradyografisi alındı.

1 agcttccgag aggcagccga tgtgagcatg tgcgcacaga ttcgtctccc aatggcatgg
61 cagcttcaag gaaaattatt ttgaacagac ttgaatgcat aagattaaag ttaaagcaga
121 agtgagaaca agaaagcaaa gagcagactc tttcaactga gaatgaatat tttgaagccc
181 aagattttta agtgatgatg attagagtcg tacctaaaag agactaaaaa ctccatgtca
241 agctctggac ttgtgacatt tactcacagc aggcattggca attttagcct cacaactttc
301 agacagataa agacttggag gaaataactg agacgactcc ctgaccagg aggttaaatca
362 attcagggg gacactggaa ttctcctgcc agc atg gtg aac tcc acc cac cgt ggg
417 atg cac act tct ctg cac ctc tgg aac cgc agc agt tac aga ctg cac
465 agc aat gcc agt gag tcc ctt gga aaa ggc tac tct gat gga ggg tgc
513 tac gag caa ctt ttt gtc tct cct gag gtg ttt gtg act ctg ggt gtc
561 atc agc ttg ttg gag aat atc tta gtg att gtg gca ata gcc aag aac
609 aag aat ctg cat tca ccc atg tac ttt ttc atc tgc agc ttg gct gtg
657 gct gat atg ctg gtg agc gtt tca aat gga tca gaa acc att atc atc
705 acc cta tta aac agt aca gat acg gat gca cag agt ttc aca gtg aat
753 att gat aat gtc att gac tcg gtg atc tgt agc tcc ttg ctt gca tcc
801 att tgc agc ctg ctt tca att gca gtg gac agg tac ttt act atc ttc
849 tat gct ctc cag tac cat aac att atg aca gtt aag cgg gtt ggg atc
897 agc ata agt tgt atc tgg gca gct tgc acg gtt tca ggc att ttg ttc
945 atc att tac tca gat agt agt gct gtc atc atc tgc ctc atc acc atg
993 ttc ttc acc atg ctg gct ctc atg gct tct ctc tat gtc cac atg ttc
1041 ctg atg gcc agg ctt cac att aag agg att gct gtc ctc ccc ggc act
1089 ggt gcc atc cgc caa ggt gcc aat atg aag gga gcg att acc ttg acc
1137 atc ctg att ggc gtc ttt gtt gtc tgc tgg gcc cca ttc ttc ctc cac
1185 tta ata ttc tac atc tct tgt cct cag aat cca tat tgt gtg tgc ttc
1233 atg tct cac ttt aac ttg tat ctc ata ctg atc atg tgt aat tca atc
1281 atc gat cct ctg att tat gca ctc cgg agt caa gaa ctg agg aaa acc
1329 ttc aaa gag atc atc tgt tgc tat ccc ctg gga ggc ctt tgt gac ttg
1377 tct agc aga tat taa atggggacag agcacgcaat ataggaacat gcataagaga
1432 ctttttact cttaccctac ctgaatattg tacttctgca acagctttct cttccgtgta
1492 gggactagggt tgagatatcc atttgtgtaaa tttaagccta tgatttttaa tgagaaaaa
1552 tgcccagtct ctgtattatt tccaatgtca tgctactttt ttggccataa aatatgaatc
1612 tatgttatag gttgtaggca ctgtggattt acaaaaagaa aagtccttat taaaagctt

Şekil.2 MC4R gen bölgesinin nükleotid dizisi, amplifikasyon ve DNA dizi analizi için kullanılan primerlerin yerleri

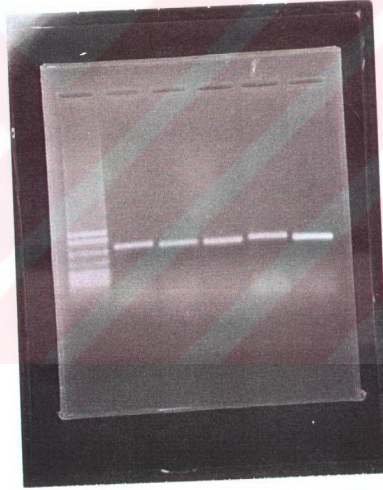
BULGULAR

Bu çalışmada, 40 obez hastanın ikisinde MC4R gen polimorfizmi saptandı. Bunların biri kodon 103'te valin yerine izolösin gelmesiyle karakterizedir (Şekil 4). Diğeri ise kodon 169'da saptanmış olup G→T polimorfizmidir ve Şekil 8'te gösterilmiştir. Bunlar daha önce bilinen ve saptanan polimorfizmlerdir. Bir hastada ise kodon 274'te heterozigot mutasyon saptanmıştır (Şekil 5).

MC4R geninde ortaya çıkan mutasyonların taranabilmesi için, MC4R geni yaklaşık 420 baz çifti uzunluğunda amplifikasyon ürünü veren MF1-MR3, MF2-MR2 ve MF3-MR1 primer çiftleri kullanılarak çoğaltılmıştır. Şekil 3'te çoğaltılmış olan MC4R genine ait bölgeler gösterilmektedir. Amplifikasyon ürünleri % 1'lik agaroz jelde pBR322/Msp I markını ile birlikte yürütülerek kontrol edilmiştir.

1 2 3 4 5 6

pBR322/Msp I kesimi
fragmant uzunlukları
1. 603 bp
2. 527 bp
3. 402 bp

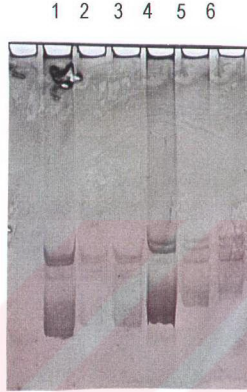


--- 420 bp

Şekil 3. MC4R geni amplifikasyon ürünleri

1. pBR322/Msp I markır DNA
2. MF1-MR3 primerleri kullanılarak elde edilen amplifikasyon ürünü
3. MF2-MR2 primerleri kullanılarak elde edilen amplifikasyon ürünü
4. MF2-MR2 primerleri kullanılarak elde edilen amplifikasyon ürünü
5. MF1-MR3 primerleri kullanılarak elde edilen amplifikasyon ürünü
6. MF3-MR1 primerleri kullanılarak elde edilen amplifikasyon ürünü

PCR ile elde edilen amplifikasyon ürünlerinde mutasyon olup olmadığının anlaşılması için SSCP tekniği ile tarama yapılmıştır. Bu yöntemle yapılan taramalar sonucunda kodon 103'de yer alan mutasyonun varlığı bu teknik ile önceden tesbit edilebilmiştir (Şekil 4). 4 numaralı kuyucuktaki örnek 5 ve 6 numaralı kuyucuklardan farklı bir bant paterni göstermektedir. Kontrole göre farklı olan bant paterni bu bölgede mutasyon olabileceğini göstermektedir.



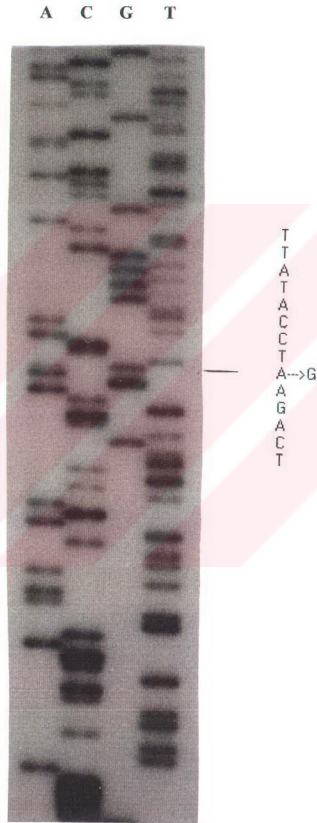
Şekil 4. SSCP tekniği ile kodon 103'de yer alan mutasyonun gösterilmesi

1. Hasta (F2-R2 amplifikasyon ürünü)
2. Hasta (F2-R2 amplifikasyon ürünü)
3. Kontrol (F2-R2 amplifikasyon ürünü)
4. Hasta (F1-R3 amplifikasyon ürünü)
5. Hasta (F1-R3 amplifikasyon ürün)
6. Kontrol (F1-R3 amplifikasyon ürünü)

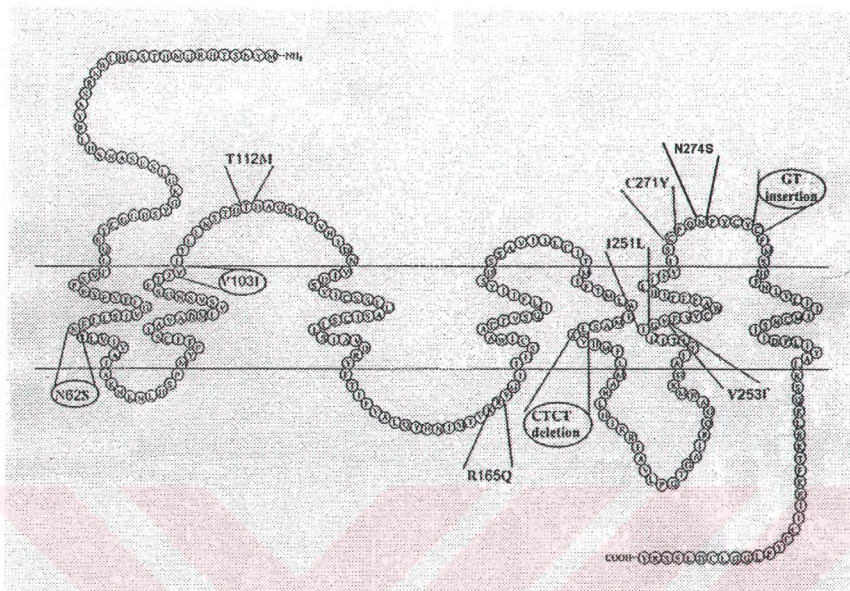
DNA dizi analizi yöntemi kullanılarak MC4R geninde ortaya çıkan mutasyonlar araştırılmıştır. Bu çalışmada, MC4R geninde iki farklı polimorfizm saptandı. Bunların biri kodon 103'te valin yerine izolösin gelmesiyle karakterizedir ve Şekil 4'te gösterilmiştir. Diğeri ise kodon 169'da saptanmış olup G→T nükleotid değişimidir ve Şekil 8'de gösterilmiştir. Bir hastada ise kodon 274'te heterozigot mutasyon

saptanmıştır (Şekil 5). Bu mutasyon hastanın kızkardeşinde de bulunmuştur. Ancak oğlu mutasyon taşımamaktadır. Bu ailenin soy ağacı Şekil 7’de gösterilmiştir.

Bu mutasyonunun ve şu ana dek rapor edilen diğer bazı mutasyonların polipeptid zinciri üzerindeki yerleşimi Şekil 6’da gösterilmiştir.

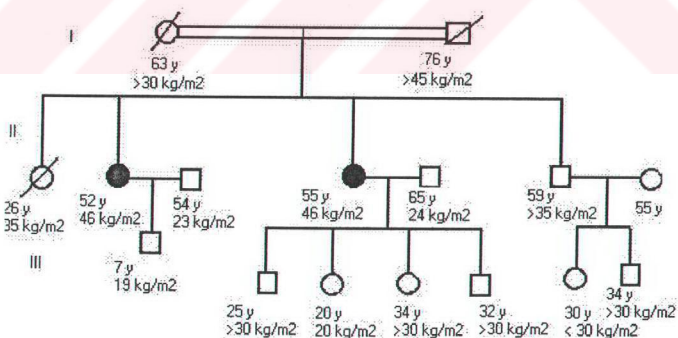


Şekil 5. N274S mutasyonunun gösterilmesi



Şekil 6. N274S ve diğer mutasyonların polipeptid zincirindeki yerleşimi

Mutasyon tespit edilen ailenin soy ağacı aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 7. Mutasyon tespit edilen ailenin soy ağacı

İndeks vaka 52 yaşında olup, boy 158 cm ağırlık ise 104 kg, BMI 41.7 kg/m² dir. Ablasında ise boy 160 cm, ağırlık 110 kg BMI: 43 kg/m²dir. Her iki kardeş de morbid obezdir. Bu hastaların biyokimyasal ve hormonal değerleri Tablo 2'de verilmiştir. Hastalar doğum kilolarını bilmemektedirler. İndeks olgu 7-8 yaşından sonra hızla kilo aldığını, iştahının fazla olduğunu, 11-12 yaşında 98 kg olduğunu, 20 yaşında 104 kg ve 162 cm boyunda olduğunu belirtmektedir. Menstruasyonun 12 yaşında başladığını, adölesan çağına (puberteye) normal girdiğini belirtmektedir. 26 yaşında evlenen hasta 1993'te doğum yapmış, doğum sonrası menstruasyon düzensizlikleri nedeniyle hormon replasman (Klimen tablet) tedavisine başlanmıştır. Hastada hipertansiyon 1 yıl önce saptanmış ve beta bloker (Beloc zoc 50 mg tb.1x1) almaktadır. Diabetes mellitus öyküsü yoktur. Hastanın anne ve babası akraba (teyze torunları) olup her ikisinin de obez olduğu bildirilmiştir.

Hastanın ablası da çocuklukta obez olduğunu ve normal olarak puberteye girdiğini belirtmiştir, evlidir ve çocukları vardır. Diabetes mellitus tanısı 6 ay önce konmuş ve metformin tablet (2x1) kullanmaktadır. Hipertansiyon 7 yıl önce başlamış ve Hyzaar tablet (1x1) kullanmaktadır. 37 yaşında histerektomi operasyonu geçirmiştir.

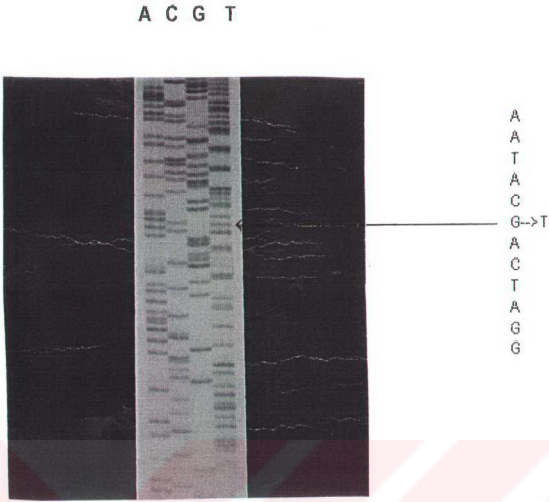
Tablo 2'de görüldüğü gibi indeks olgunun açlık kan şekeri ve insülin düzeyleri normal olup, lipid düzeyleri normaldir. Tiroid fonksiyon testleri, ACTH, kortizol ve idrarda serbest kortizol (54 µg/24h) normaldir. DHEA-SO₄ düzeyi normalin altında bulunmuştur. FSH ve LH hafif yüksektir ancak estradiol normaldir. GH ve parathormon ve kalsiyum düzeyleri normaldir. Kemik mineral dansitometrisi (BMD) normal olarak değerlendirilmiştir (T skoru= +0.18).

Abla oral antidiabetik tedavide olduğu için, glisemi ve insülin düzeyleri normal olarak saptanmıştır ancak hiperlipidemisi mevcuttur. FSH ve LH yüksek, parathormon hafif yüksek bulunmuş ve diğer hormon sonuçları normal olarak değerlendirilmiştir.

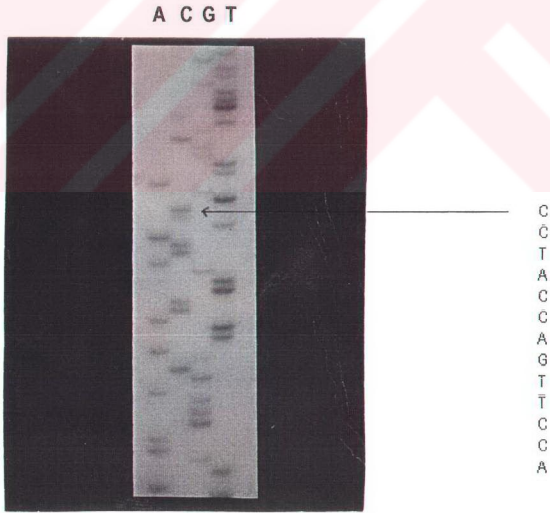
Hastanın 7 yaşındaki oğlunda bu mutasyon saptanmamıştır ve halen VKI ise 19.4 kg/m²dir.

Tablo 2. Kodon 274 A→G Mutasyonu Tespit Edilen Hasta ve Ailesine ait Biyokimya ve Hormon Sonuçları

	Hasta (K)	Abla (K)	Çocuk (E)
Yaş	52	55	7
Boy (cm)	158	160	126
Kilo (kg)	104	110	31
VKİ (kg/m2)	41.7	43	19.4
Yağ Kitlesi (%22-30)	46.5	47.1	
Glukoz (65-107 mg/dl)	82	73	
Üre (15-44 mg/dl)	22	32	
Kreatinin(0.5-1.5mg/dl)	0.6	0.8	
Kolesterol (150-240mg/dl)	185	255	
Trigliserid (50-200 mg/dl)	190	345	
HDL Kol. (35-65mg/dl)	38	30	
LDL Kol. (60-160 mg/dl)	109	156	
VLDL Kol. (0-40 mg/dl)	38	69	
Serbest T3(1.8-4.2 pg/ml)	3.6	3.8	
Serbest T4 (0.8-1.9 ng/dl)	1.2	1.1	
TSH (0.4-4.6 mIU/L)	1.4	0.9	
FSH (1.9-11.6 mIU/L)	17.1	29	
LH (2.5-12.1 mIU/L)	12.9	13.4	
Prolaktin (1.9-25 mg/ml)	14.1	5.4	
Estradiol (< 30 pg/ml)	47.7	-	
Progesteron (0.39-5.4 ng/ml)	0.3	-	
Total testosteron (63-120 ng/dl)	20	56.2	
DHEA-SO4 (35-430 µg/dl)	<30	48.2	
ACTH (<46 pg/ml)	14.3	16.6	
Kortizol (5-25 µg/dl)	17.5	10.2	
Growth hormon (0.06-8.6 ng/ml)	0.21	0.4	
Parathormon (12-72 pg/ml)	28.1	84.3	
İnsülin (<30 µIU/ml)	15.5	16.2	
C peptid (0.9-4 ng/ml)	2.1	5	
Plazma renin aktivitesi(1.5-5 ng/ml)	0.3	7.6	
Aldosteron (8-172 pg/ml)	158.3	117	
İdrarda serbest kortizol (10-100 µg/24h)	54	-	
Kalsiyum (8.5-10.5 mg/dl)	9.7	-	
BMD (T skoru)	+0.18	-	



Şekil 8. Kodon 169'da yer alan G→T polimorfizminin DNA dizi analizi yöntemi ile gösterilmesi



Şekil 9. MC4R genine ait normal baz dizilimi

TARTIŞMA VE SONUÇ

İnsan obezitesi genetik ve çevresel etkenlerden kaynaklanan bir hastalıktır ve çağımızda pandemi halini almıştır. Bugüne kadar yapılan çalışmalar obezite gelişiminde genetik faktörlerin çok önemli rol oynadığını göstermiştir. Bugüne kadar tek bir gen defektiye bağlı obezite veya monogenik sendromlar 5 gen bozukluğunda ortaya konmuştur. Bunlar leptin, leptin reseptör, prohormon konvertaz 1, proopiomelanokortin ve melanokortin-4 reseptör gen mutasyonlarıdır. Ancak bunlar nadir görülmektedir. Aslında toplumda yaygın olarak görülen obezite poligenik, yani birçok gen tarafından kontrol edilmektedir. Bu nedenle genom taramaları yapılarak obeziteye neden olabilecek lokuslar bulunmaya çalışılmaktadır. Tek gen mutasyonuna bağlı obezite bugüne kadar yapılan çalışmalarda nadir görülse de bu hastaların klinik özellikleri, hormonal değişiklikleri obezite ve yağ dağılımı hakkında bize büyük bilgiler sağlamaktadır. O nedenle, bu konudaki araştırmalar giderek yoğunlaşmıştır.

Bu çalışmada Türk obez popülasyonunda MC4R gen mutasyon sıklığı araştırılmıştır. 40 obez hastada yapılan bu moleküler biyoloji araştırmasında bir ailede MC4R geninde heterozigot mutasyon saptandı. Bu mutasyon MC4R geninde 274 nolu kodonda saptanmıştır ve Adenin yerine Guanin gelmesiyle karakterizedir. Bu mutasyon şimdiye kadar dünyada bildirilmemiş bir mutasyondur.

Çalışma sonunda incelenen örneklerin MC4R geninde biri Val103Ile olmak üzere toplam iki polimorfizm elde edilmiştir. Diğer polimorfizm ise kodon 169'da ortaya çıkmaktadır. Ancak incelenen tüm örneklerde bu polimorfizm gözlenmiştir. Bugüne kadar birbirinden bağımsız olarak beş gurubun yaptığı çalışmalarda toplam 1136 kişide MC4R gen mutasyonları taranmıştır (22). 771 kişi aşırı obez ($VKI > 40 \text{ kg/m}^2$), 315 kişi $VKI < 30 \text{ kg/m}^2$ ve 50 kişi $VKI = 30-40$ arasında bulunmuştur. 315 zayıf kişide ise ek mutasyon bulunamamıştır. Bu grupların yaptıkları çalışmalarda hem aşırı obezlerde, hem de zayıflarda üç missense değişiklik, Val103Ile, Thr112Met ve Ile251Leu, ile bir sessiz mutasyon saptanmıştır. Buna karşılık, sadece 18 aşırı obez kişide 15 mutasyona uğramış MC4R alleli bulunmuştur (771'de %2.3).

Melanokortin-4 reseptörü 332 aminoasitli bir protein olup tek bir ekzonu vardır ve 18 nolu kromozomda kodlanır. MC4R G proteinle etkileşen membranı 7 defa geçen bir transmembran reseptörüdür ve adenilat siklazı aktive ederek etkisini gösterir. Melanokortin-4 reseptörü alfa melanosit stimüle edici hormon (α -MSH) ile stimüle edilirken agouti related protein (AGRP) ile inhibe edilir. Beyindeki ve özellikle hipotalamustaki melanokortin yolunun enerji dengesindeki rolü önceki çalışmalarla gösterilmiştir. Melanokortin-4 reseptörünün olmaması durumunda hiperfaji ve obezite geliştiği farelerde

gösterilmiştir (9). MC4R gen mutasyonuna bağlı obezite ilk defa 1998'de heterozigot mutasyon olarak iki ayrı ailede bildirilmiştir (17,18). Bunlar erken yaşta başlayan şiddetli obez hastalardır. Daha sonra Gu ve arkadaşları iki missense mutasyon, Hinney ve arkadaşları 9 missense mutasyon tanımlamıştır ve 2000 yılına kadar dünyada en azından 20 adet MC4R mutasyonu saptanmıştır. Bu nedenle, MC4R gen mutasyonu tek gen mutasyonuna bağlı obezitenin en sık nedenidir ve toplumdaki obezitenin % 3-4'ünü oluşturur. Ancak bugüne kadar MC4R gen mutasyonlu hastaların klinik özellikleri veya fenotipi yeterince belirtilmemiştir. Ancak 2000 yılında yayınlanan iki çalışma ile (21,22) MC4R gen mutasyonu fenotipi daha da belirginleşmiştir.

MC4R gen mutasyonu bulunan kadın hastanın klinik özellikleri ve laboratuvar bulguları Tablo 2'de verilmiştir. Bu kadın hastada obezite çocukluk çağına başlamıştır ve hiperfaji olduğunu belirtmiştir. MC4R gen mutasyonu saptanan diğer hastalarda da çocuklukta erken başlayan obezite mevcuttur (21,22). Hasta şu anda 52 yaşında olup boy 158 cm ağırlık 104 kg VKİ 41.7 kg/m² dir ve morbid obezdir ve vücut yağ kitlesi ise % 46.5 olup normal değer (% 22-30) çok üstündedir. Aynı şekilde hastanın ablasında da morbid obezite vardır. Ancak obezite şiddeti leptin gen mutasyonu kadar şiddetli değildir (37).

Diğer tek gen mutasyonu taşıyan obezlerde yani leptin, leptin reseptör, POMC ve prohormonkonvertaz1 gen mutasyonu taşıyan obezlerde puberte gelişimi ve reproduktif fonksiyonlar bozuk olduğu halde MC4R gen mutasyonu taşıyan obezlerde böyle bir bozukluk bildirilmemiştir (21,22). Bu çalışmada mutasyon tespit edilen hastada ve kardeşinde de puberte normal ve zamanında oluşmuştur ve her ikisinin de çocuğu vardır.

Tiroid fonksiyon testleri, bazal kortizol ve ACTH, FSH, LH, E₂ düzeyleri normaldir. MC4R mutasyonu diğer hastalarda da tiroid fonksiyonları, ACTH ve kortizol düzeyleri normal bulunmuştur.

MC4R mutasyonlu diğer hastalarda öğlisemi ve insülin yüksekliği saptanmıştır (21). Ancak bu çalışmadaki iki hastada da insülin düzeyleri normal sınırlarda bulunmuştur ancak hastanın ablasının oral antidiabetik tedavisinde olamsı nedeniyle insülin düzeyinin normal olduğu düşünülmektedir.

Bugüne kadar MC4R mutasyonu saptanan ailelerin çoğunda mutasyonlar dominant geçişli iken bir ailede (N62S mutasyonu) resesiftir. Çalışma kapsamında mutasyon tesbit edilen ailede de otozomal dominant geçiş gözlenmiştir.

Mutasyon taşıyan hastalarımızda BMD (kemik mineral dansitometrisi), PTH ve kalsiyum düzeyleri normal bulunmuştur. MC4R gen mutasyonunun kemik mineral metabolizmasını bozmadığı saptanmıştır. Farooqi ve arkadaşları ise BMD'nin arttığını ileri sürmüşlerdir (21). Bu nedenle bu konuda ileri araştırmalara gerek vardır.

MC4R yetmezliği olan farelerde boy uzun olmasına rağmen insanlarda belirgin bir boy uzaması saptanmamıştır (22). Bizim olgularımızda da boy normaldir ancak Farooqi, çocuk hastalarda boyun daha uzun olduğunu rapor etmiştir (21).

Olgularda GH düzeyi ve DHEA.SO₄ düzeyleri baskılı olup bu morbid obezitede görülebilen bir durumdur ve MC4R gen mutasyonlarına spesifik değildir. Bu konuda diğer mutant hastalara ait bilgi yoktur.

Özetle, insan MC4R yetmezliği leptin gen mutasyonunda olduğu gibi fare modeline tam olarak benzememektedir. Benzerlikler reproduktif sistemin normal olması, puberteye girişin normal olması, hiperfaji olmasıdır. Ancak farede boy uzaması ve hiperinsülinemi olmasına rağmen bu çalışmada tespit edilen mutasyonlu hastaların boyları normaldir ve ilginç olanı birinde insülin normalken diğerinde Diabetes mellitus vardır. MC4R gen mutasyonlu diğer hastalarda hiperinsülinemi saptanmıştır ancak diabet bildirilmemiştir (21).

Yukarıda belirtilen bulgular ve diğer MC4R mutasyonu taşıyan hastalarla yapılan karşılaştırmalar bu hastalar arasında bazı benzerlik ve farklılıkların olduğunu göstermiştir. O nedenle daha fazla sayıda hastada çalışmalar yapılarak MC4R gen mutasyonuna bağlı klinik fenotipin daha iyi belirlenmesi gerekmektedir. Tek gen mutasyonuna bağlı obezitenin detaylı araştırılması insanlarda iştah, vücut ağırlığı ve büyümenin düzenlenmesindeki moleküler mekanizmanın ortaya çıkarılmasında büyük faydası olacaktır. Yapılan bu çalışma halen devam etmekte olup Türk toplumunda ne oranda MC4R gen mutasyonu olduğunun saptanması ancak çalışma sonuçlarıncaya ortaya çıkacaktır.

ÖZET

İnsan obezitesinin gelişmesinde genetik faktörlerin potansiyel katkısı obezitenin beş monogenik formunun tanımlanmasıyla ispatlanmıştır. Bunlar leptin, leptin reseptörü, prokonvertaz 1, proopiomelanokortin ve melanokortin-4 reseptör genleridir. Melanokortin-4 reseptörü hariç bu genlerdeki mutasyonlar endokrin anormalliklerle birlikte obezitenin sendromik formlarına neden olurlar. MC4R gen mutasyonları diğer tek gen mutasyonlarından daha sık (%3-4) obeziteye neden olmaktadır.

Memeli enerji homeostazının kontrolünde santral melanokortinerjik yolağın önemi obez insan ve fareler üzerinde yapılan son genetik çalışmalarda belirtilmiştir.

Bu çalışmada, otozomal dominant tipte geçiş gösteren obeziteye neden olabilen MC4R gen mutasyonların belirlenmesini amaçladık. Bu amaçla polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP) analizi ve DNA dizi analizi teknikleri kullanılarak Türk toplumunda otozomal dominant geçişli 40 obez hastada MC4R geninde ortaya çıkan mutasyonların taraması yapılmıştır. MC4R geninde, kodon 274'te yeni bir heterozigot mutasyon tespit ettik. Ayrıca, kodon 103 ve kodon 169'da ise iki yaygın polimorfizm de tanımladık.

Heterozigot mutasyonlu hasta ve ablası morbid obezite, çocukluk çağında başlayan obezite, hipertansiyon, normal reproduktif fonksiyon ve boy uzunluğuna sahipti. Fakat, ablada diabetes mellitus vardı. İndeks vakada açlık kan şekeri ve kemik mineral dansitesi normaldi. Hormon analizleri indeks vakada normal tiroid testleri, kortizol, ACTH, PRL ve GH düzeyleri olduğunu göstermiştir. Klinik ve laboratuvar bulgular daha önce rapor edilen MC4R gen mutasyonlu hastalarla karşılaştırıldığında, morbid obezite, normal reproduktif fonksiyon, normal tiroid fonksiyon testleri ve hipotalamo-pitüiter-adrenal aks olması ile benzer klinik özellikler olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, diğer mutant hastalarda BMD artışı olmasına rağmen bizim hastamızda BMD normaldi. Ayrıca, rapor edilen diğer vakaların aksine hiperinsülinemi ve boy uzunluğunda artış tespit edemedik.

Bulgularımız, MC4R gen mutasyonunun Türk obez toplumunda 1/40 oranında obezitenin sorumlusu olduğunu gösteriyor. Ayrıca, bazı klinik özellikler daha önce rapor edilen diğer mutantlardan farklıdır. Bu nedenle, MC4R gen mutasyonu fenotipinin tamamen tanımlanması için ileri klinik çalışmalar gerekmektedir.

SUMMARY

The potential implication of genetic factors in the development of human obesity is demonstrated by the description of five monogenic forms of obesity. These genes are leptin, the leptin receptor, proconvertase 1, pro-opiomelanokortin and melanocortin-4 receptor (MC4R). Except for MC4R, mutations in these genes cause syndromic forms of obesity, associated with endocrin abnormalities. MC4R gene mutations could be a more frequent (%3-4) cause of obesity than the other monogenes.

The importance of central melanocortinergic pathways in the control of mammalian energy homeostasis has been highlighted recently by genetic studies in obese humans and mice.

In this study, we aimed to identify MC4R gene mutations which may cause autosomal dominant inherited obesity. For this purpose we used polymerase chain reaction (PCR), single stranded conformational polymorphism (SSCP) analysis and DNA sequencing techniques in 40 autosomal dominant inherited Turkish obese subjects and screened MC4R gene mutations. We have identified a novel heterozygous mutation at codon 274 of the MC4R gene. Moreover, at codon 103 and 169 two common polymorphisms also determined.

Patient with heterozygous mutation and her older sister have early onset obesity, hypertension, normal reproductive function and height. But sister has diabetes mellitus. Index case has normal fasting blood glucose and bone mineral density. Hormone analysis showed that index case has normal thyroid hormone tests, cortisol, ACTH, PRL and GH levels. When clinical and laboratory data compared with previously reported patients with MC4R gene mutations, similar clinical features seem to be morbid obesity, normal reproductive function, normal thyroid function tests and hypothalamo-pituitary-adrenal axis. However, our patient has normal BMD despite increased BMD in other mutant patients. Moreover we could not detect hyperinsulinemia and increased height contrary to other reported cases.

Our data show that MC4R gene mutation is responsible for obesity as 1/40 in Turkish obese population. However, some clinical features are different than other previously reported mutant patients. Thus, further clinical studies are needed to fully characterize the MC4R gene mutation phenotype.

KAYNAKLAR

1. Allison D.B., Fontaine K.R., Manson J.E., Stevens J. and Van Itallie T.B.: Annual deaths attributable to obesity in the United States. JAMA, 282:1530-1538, 1999.
2. Must A., et al.: The disease burden associated with overweight and obesity. JAMA, 282:1523-1529, 1999.
3. Obesity: preventing and managing the global epidemic. World Health Organization. Geneva, Switzerland, 1998.
4. Mokdad A.H., et al.: The spread of the obesity epidemic in the United States, 1991-1998. JAMA, 282:1519-1522, 1999.
5. Comuzzie A.G. and Allison D.B.: The search for human obesity genes. Sciences, 280:1374-1377, 1998.
6. Hill J.O. and Peters J.C.: Environmental contributions to the obesity epidemic. Sciences, 280:1371-1374, 1998.
7. Deurenberg P., Ya.P.M.: The Assessment of Obesity: methods for measuring body fat and global prevalence of obesity p:13 Bailier's Clin.Endocr. and Metab. Ed. Holly J.M.P., 1999
8. Mountjoy K., Mortrud M., Low M., Simerly R., Cone R.: Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. Mol. Endocrinol, 8: 131-141, 1994.
9. Huszar D., Lynch C., Fairchild Huntress V.: Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. Cell, 88: 131-141, 1997.
10. Fan W., Boston B.A., Kesterson R.A., Hruby V.J., Cone R.D.: Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. Nature, 385:165-168, 1997.
11. Gantz I., Miwa H., Kondo Y., et al.: Molecular cloning, expression and gene localization of a fourth melanocortin receptor. J. Biol. Chem., 268:15174-15179, 1993.

12. Mountjoy K.G., Robbins L.S., Mortrud M.T. and Cone R.G.: Science, 1992.
13. Labbe O., Desernaud F., Eggerickx D., Vassart G. and Parmentier M.: Biochemistry, 33: 4543-4549, 1994.
14. Sundaramurthy D., Campbell D.A., Leek J.P., Markham A.F. and Pieri L.F.: Assignment of the melanocortin 4 receptor gene to human chromosome band 18q22 by in situ hybridisation and radiation hybrid mapping. Cytogenet. Cell Genet., 82: 97-98, 1998.
15. Ollman M., Wilson B., Yang Y.: Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti related protein. Science, 278: 135-138, 1997.
16. Seeley R.J., Yagaloff K.A., Fisher S.L., Burn P., et al.: Nature, 390: 349, 1997.
17. Vaisse C., Clement K., Guy-Grand B. And Froguel P.: A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. Nat. Genet., 20: 113-114, 1998.
18. Yeo G.S., Farooqi I.S., Aminian S., Halsall D.J., Stanhope R.G. and O'Rahilly S.: A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. Nat. Genet., 20: 111-112, 1998.
19. Gu W., Tu Z., Kleyn P.W., Kissebach A., Allison D., et al.: Identification and functional analysis of novel human melanocortin-4 receptor variants. Diabetes, 48: 635-639, 1999.
20. Hinney A., Schimdt A., Nottebom K., Hebebrand J., et al.: Several mutations in the MC4R gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. J. Clin. Endocrinol. Metab., 84: 1483-1486, 1999.
21. Farooqi I.S., Yeo G.S., Keogh J.M., Aminian S., Jebb S.A., Butler G., Cheetham T. and O'Rahilly S.: Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin-4 receptor deficiency. J. Clin. Invest., 106:271-279, 2000.

22. Vaisse C., Clement K., Durand E., Hercberg S., Guy-Grand B. and Froguel P.: Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J. Clin. Invest.*, 106: 253-262, 2000.
23. Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Gruters A.: Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet.*, 19:155 – 157, 1998.
24. Hinney A, Becker I, Heibult O, et al.: Systematic mutation screening of the pro-opiomelanocortin gene: identification of several genetic variants including three different insertions, one nonsense and two missense point mutations in probands of different weight extremes. *J Clin Endocrinol Metab.*, 83: 3737-3741, 1998.
25. Cone R., Lu D., Koppula S.: The melanocortin receptors: agonist, antagonists and the hormonal control of pigmentation. *Recent. Prog. Horm. Res.*, 51: 287-318, 1996.
26. Hahn T., Breinger J.F., Baskin D.G., Schwartz M.W.: Coexpression of AgRP and NPY in fasting activated hypothalamic neurons. *Nat. Neurosci.*, 1: 271-272, 1998.
27. Montague C.T., Farooqi I.S., Whitehead J.P., et al.: Congenital leptin deficiency is associated with severe early onset obesity in humans. *Nature*, 387: 903-908, 1997.
28. Strobel A., Issad T., Camoin L., Özata M., Strosberg A.D.: A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet.*, 18: 213-215, 1998.
29. Clement K., Vaisse C., Lahlou N., et al.: A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*, 392: 398-401, 1998.
30. Jackson RS, Creemers JWM, Ohagi S, et al.: Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nature Genet.*, 16: 303-306, 1997.
31. Yen M.Y., Yen T., Panc C., Liu J., Wei Y.: Mitochondrial DNA mutation in Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Invest. Opht. and Visual Sci.*, 33: 2561-2566, 1992.

32. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel .S., Erlich H.A., et al.: Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239: 487-491, 1988.
33. Kanazawa H., Noumi T., Futai M.: Methods Enzymol., 126: 595-603, 1986.
34. Chrambach A. and Rodbard R.: Polyacrylamide gel electrophoresis. Science, 71, 172, 982: 440-451, 1971.
35. Ainsworth P.J., Surh L.C., Coulter-Mackie M.B.: Diagnostic single strand conformational polymorphism (SSCP) : A simplified nonradioisotopic method as applied to a Tay-Sachs B1 variant. Nucleic Acid Res., 19, 2: 405-406, 1991.
36. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.: DNA sequences with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 74: 5463-5467, 1977.
37. Özata M., Özdemir İ.Ç., Licinio J.: Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects. J. Clin. Endocrinol. Metab., 84: 3686-3695, 1999.