

УДК 575.224+577.125:599.9

©Коллектив авторов

СКРИНИНГ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ ПРООПИОМЕЛАНОКОРТИНА У БОЛЬНЫХ КОНСТИТУЦИОНАЛЬНО-ЭКЗОГЕННЫМ ОЖИРЕНИЕМ.

**Ю.А.Панков¹, С.Б. Яцышина^{1,2}, С.К. Карнова¹,
М.К. Чехранова¹, Ю.П. Попова³, О.Н. Григорян³, Е.И. Рогаев².**

¹Эндокринологический научный центр РАМН, ул. Дмитрия Ульянова 11,
117036 Москва, Россия, Эл. почта: yuri-pankov@mtu-net.ru

²Научный центр психического здоровья РАМН, 113152, Москва,
Эл. почта: rogaev@dol.ru

³Институт Питания РАМН, 109240 Москва, факс: (095)-113-87-00.

Проопиомеланокортин (ПОМК) является предшественником ряда гормонов: адренотропного гормона (АКТГ), β - и γ -липотропных гормонов (ЛПТ), α - и β - и γ -меланоцитстимулирующих гормонов (МСГ), β -эндорфина. α - и β - МСГ синтезируются в нейронах гипоталамуса и их синтез активируется лептином. Они участвуют в регуляции пищевого поведения и энергетического обмена у человека и грызунов путем активации в гипоталамусе рецепторов меланокортинов (МС3-R и МС4-R). В настоящем исследовании проведен скрининг мутаций (методами ПЦР, SSCP, секвенирование ДНК) в кодирующей области гена ПОМК и анализ ассоциаций с целью оценки роли полиморфизмов и мутаций в этом гене в развитии конституционально-экзогенного ожирения у людей.

Обследованы 228 (173 женщины и 55 мужчин) больных с конституционально-экзогенным ожирением, 145 доноров крови (67 женщин и 78 мужчин) без ожирения в анамнезе и 170 женщин без видимого ожирения на момент обследования (контрольная группа). Обнаружены 8 полиморфных вариантов в кодирующей области гена ПОМК: вставки, точечные мутации, приводящие к заменам аминокислот, и точечные молчание полиморфизмы.

Наибольший интерес представляют: 1) гаплотип из двух мутаций: инсерции 6 пар оснований (GGGCCC) в 176 кодон, что приводит к вставке двух аминокислот (Arg-Ala), и точечной замены (G-7316-T), образующей стоп-кодон в положении 180 а.к. внутри последовательности g- ЛПТ, который в гетерозиготном состоянии обнаружен у 4 женщин из 69 (5,8%) пациентов с морбидным ожирением и не выявлен в контрольной группе; 2) впервые обнаружена точечная мутация (T-7130-C; Phe118Leu) в области связывания α -МСГ с рецептором МС4-R в гетерозиготном состоянии у женщины, страдающей ожирением с раннего детства; 3) замена (A-7341-G; Glu188Gly), достоверно чаще встречающаяся в гетерозиготном состоянии в контрольной группе (3,79%), чем у больных ожирением (0,66%) и, вероятно, оказывающая протективное влияние. Результаты проведенного генетического обследования двух родословных носителей мутаций 1 и 2 позволяют предполагать доминантное влияние этих мутаций на развитие конституционально-экзогенного ожирения у женщин.

Ключевые слова: ожирение, ген проопиомеланокортина, скрининг мутаций.

ВВЕДЕНИЕ. К настоящему времени обнаружены 5 моногенных форм ожирения у человека в сочетании с различной эндокринной патологией [1- 6]. Они обусловлены мутациями в генах лептина, рецептора лептина, конвертазы прогормонов-1, проопитимеланокортина и наследуются по рецессивному типу. Однако данные генетико-эпидемиологических исследований свидетельствуют о том, что в большинстве случаев ожирение представляет собой мультифакториальное заболевание, в котором влияние генетической компоненты составляет 40-70 % [7, 8].

По мнению Commuzzie [9], ожирение, как и другие мультифакториальные метаболические нарушения, является либо следствием аддитивного взаимодействия ограниченного числа полиморфных локусов, либо результатом сочетания редких мутаций (с различной пенетрантностью) большого количества генов. На современном этапе исследований молекулярно-генетических механизмов ожирения основной задачей является поиск генетических полиморфизмов и мутаций, предрасполагающих к развитию данного заболевания.

В последние годы накоплено достаточно данных, указывающих на значительную роль генетических изменений ПОМК в развитии ожирения.

Ген ПОМК, состоящий из трех экзонов и двух интронов, кодирует белок-предшественник, подвергающийся тканеспецифичному процессингу с образованием ряда гормонов, обладающих собственным биологическим действием. Первый экзон содержит 5'-нетранслируемую область мРНК, второй экзон - сигнальный пептид и 8 а.к. N-терминального пептида. Третий экзон кодирует последовательность АКТГ, кортикотропиноподобный пептид (КТПП), α -, β - и γ - МСГ, β - и γ - ЛТГ и β -эндорфина [10].

Доказано, что α - и β - МСГ синтезируются в нейронах аркуатного ядра гипоталамуса под действием лептина и принимают участие в регуляции пищевого поведения и энергетического обмена у человека и грызунов путем активации в гипоталамусе рецепторов MC4-R [11, 12].

Krude с соавторами [5] описали у человека моногенную форму эндокринного синдрома, проявляющегося в виде вторичной недостаточности надпочечников и ожирения с раннего детства в сочетании с рыжим цветом волос. Этот синдром, наследуемый по рецессивному типу, был следствием мутаций гена ПОМК, приводящих к нарушению биосинтеза практически всех производных гормонов: АКТГ, α - и β -МСГ, β - и γ -ЛТГ и γ -эндорфина.

Известно, что у мышей искусственное повреждение гена ПОМК [13] или гена рецептора меланокортинов MC4-R [14], а также неконтролируемая гиперэкспрессия антагонистов меланокортинов (белков агутти [15]) приводит к развитию ожирения.

Кроме того, результаты полногеномного скрининга, проведенного на 458 индивидуумах из 10 семей американцев мексиканского происхождения [16], показали достоверное сцепление уровня лептина в крови с микросателлитным локусом D2S1788, картированным на хромосоме 2p21. Одним из генов - кандидатов этого района является проопиомеланокортин (ПОМК), картированный в локусе 2p23.3 [17]. Дальнейшие исследования [18] с использованием дополнительных полиморфных маркеров в этой области подтвердили наличие сцепления уровня лептина в крови с локусом ПОМК.

В настоящем исследовании проведен поиск мутаций в гене ПОМК у людей, страдающих ожирением, и анализ роли этих мутаций в развитии заболевания.

МЕТОДИКА. Обследовано 228 больных (173 женщины и 55 мужчин), страдающих конституционально-экзогенным ожирением, в возрасте 16-55 лет (средний возраст $37,1 \pm 10,9$ лет) русских (по опросу) жителей Москвы, Подмосковья и ряда городов центра России, наблюдавшихся в НИИ Питания РАМН. Разброс значений ИМТ составил 30 - 64 кг/м² ($39,7 \pm 7,5$ кг/м², ($M \pm \sigma$)) у мужчин и 28 - 63 кг/м² ($37,2 \pm 6,4$ кг/м²) у женщин. Морбидное ожирение (ИМТ > 40 кг/м²) наблюдалось у 69 человек. В выборку не включали индивидуумов, имеющих опухоли гипофиза, дисфункции щитовидной железы и надпочечников, а также перенесших черепно-мозговые травмы и менингиты.

В качестве контроля использовали две выборки: 1) 145 (67 женщин и 78 мужчин) кадровых доноров крови - русских жителей Москвы и Подмосковья в возрасте 18 - 55 лет (средний возраст $34,6 \pm 9$ лет) без ожирения в анамнезе, ИМТ ≤ 25 кг/м² ($23,1 \pm 2,2$ кг/м²); 2) 170 женщин без видимого избытка массы тела на момент обследования.

ИМТ рассчитывали по формуле: вес/рост² (кг/м²).

Выделение геномной ДНК из лейкоцитов венозной крови проводили стандартным методом осаждения ДНК этанолом с применением фенольной экстракции [19].

Аmplификацию фрагментов гена ПОМК проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в объеме 25 мкл в течение 30 циклов (95°C - 30 сек, 64 - 65°C - 30 сек, 72°C - 1 мин.) с предварительной денатурацией при 95°C - 2 мин. и заключительной элонгацией при 72°C - 3 мин. в реакционной смеси, содержащей 66 мМ трис-HCl, pH 8,3, 16,7 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,05 мг/мл БСА, 0,01% твин-20, 8% глицерол, 1-2 мМ MgCl₂, 0,2 мМ dNTPs, 0,4 мкМ каждого праймера, 2,5 ед/100мкл Taq-полимеразы (ЦНИИЭ, Москва) и 0,05-0,1 мкг ДНК. Специфичность фрагментов ПЦР оценивали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с бромистым этидием 0,25 мкг/мл в 1X TAE буфере под контролем УФ освещения.

Описание последовательностей использованных праймеров, температур отжига и размеров образующихся фрагментов приведено в таблице 1. Подбор праймеров осуществляли таким образом, чтобы амплифицировать и секвенировать всю кодирующую область гена.

Таблица 1. Праймеры, использованные для амплификации гена ПОМК

Положение	Код праймера	Последовательность 5'-3'	Размер фрагмента	Температура отжига	Концентрация MgCl ₂
Инtron 1/ Экзон 2	2F	Gcctgcctggaagatgccga	273 п.о.	650C	2мМ
Инtron 2	2R	Ctgccctggattgaatcacg C			
Инtron 2	3(1)F	Ccctcatgcccctgcgtctt	443 п.о.	640C	1мМ
Экзон 3	3(1)R	Tggccagtcagctccctctt			
Экзон 3	3(2)F	Caagaagcggcgccagct	409 п.о.	650C	1мМ
3'-UTR	3(2)R	Caaggggctttggggctcga			

Наличие мутаций в амплифицированных фрагментах гена ПОМК определяли методом конформационного полиморфизма одиночных цепей ДНК (SSCP) [20], используя прибор для электрофореза фирмы "Hoeffer". Электрофорез проводили в 8-10% ПААГ (43:1, AA:BisAA, "Sigma", (8см X 10 см X 0,8 мм)) в 0,5X TBE буфере (45 мМ трис-HCl, 45 мМ борной кислоты, 1,1 мМ ЭДТА, pH 8,0) при напряжении 300 В и температуре +4°C в течение 1,5 - 3 часов.

Идентификацию мутаций в ПЦР-фрагментах, показавших измененную подвижность в геле по сравнению с ДНК дикого типа, проводили путем секвенирования фрагментов ПЦР. Фрагменты ПЦР были очищены от примесей праймеров и нуклеотидов с помощью набора ДНК-сорб (ЦНИИЭ, Москва) по инструкции изготовителей с небольшими изменениями. ДНК элюировали в деионизованную воду и использовали в качестве матрицы для секвенирования методом cycle sequence на амплификаторе GeneAmp® PCR System 2400 ("Perkin-Elmer", США) с набором ABI PRISM® BIG Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction, ("Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division" [PE/ABI], США) согласно инструкции изготовителя. Далее образцы анализировали методом капиллярного электрофореза на ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (PE/ABI).

Для секвенирования фрагментов, содержащих вставки в гетерозиготном состоянии, предварительно проводили их клонирование в pGEM-T ("Promega") по инструкции изготовителя набора для клонирования с последующим отбором клонов, несущих мутантную цепь ДНК, с помощью ПЦР-SSCP.

Определение концентрации лептина в сыворотке крови проводили методом ELISA ("Human Leptin", DSL) согласно инструкции производителя.

Сравнение частот аллелей в группах выполнено методом χ^2 (с поправкой Йетса).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В кодирующей области гена ПОМК в гетерозиготном состоянии обнаружены 8 полиморфных вариантов (рис.1, 2, табл. 2.): одна нонсенс-мутация, две инсерции, четыре точечные мутации, приводящие к заменам аминокислот и три точечных молчащих полиморфизма, не изменяющие аминокислотной последовательности.

Вблизи сайта протеолиза ПОМК с образованием b-МСГ обнаружена замена 1) (A-7341-G; Glu188Gly), достоверно чаще встречающаяся в контрольной группе, чем у пациентов ($p=0,005$). Гаплотип из двух мутаций: 2.1) - инсерции 6 п.о. (GGGCCC) в 176 кодон, приводящей к вставке двух аминокислот (Arg-Ala), и 2.2) - точечной мутации (G-7316-T), образующей кодон, терминирующий трансляцию в положении 180 а.к. внутри последовательности γ -ЛТГ, обнаружен в гетерозиготном состоянии у 4 женщин из 69 пациентов, имеющих морбидное ожирение (ИМТ 40 - 53 кг/м²), что составляет 5,8% этой группы. В группах контроля этот гаплотип не обнаружен.

Проведено генетическое обследование семьи одной из носительниц гаплотипа Ins 176: (Arg-Ala)/180-Stop (рис.3). У трех из четырех носителей данного гаплотипа в гетерозиготном состоянии наблюдалось ожирение: у пробанда - с пубертатного возраста, у сестры пробанда (дизиготного близнеца) - в 20 лет после родов и у сына пробанда - в детстве до пубертата. Семейный анализ подтверждает предположение о влиянии данного мутантного гаплотипа на развитие конституционально-экзогенного ожирения, по крайней мере, у женщин с наследованием заболевания по доминантному типу.

Впервые обнаружена замена 6) (T-7130-C; Phe118Leu) в гетерозиготном состоянии в области связывания a- МСГ с рецептором МС4-R у одной женщины, страдающей ожирением с раннего детства и жалующейся на постоянное чувство голода.

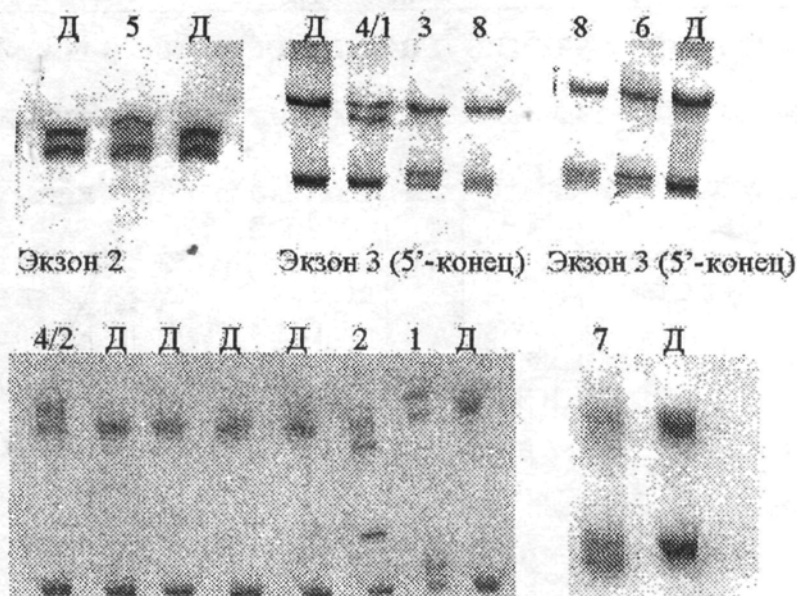


Рисунок 1.

Результаты SSCP. Фотографии ПААГ.

1-8 - Полиморфные варианты гена ПОМК (обозначения соответствуют данным в Таблице 2). Д - Фрагмент ПЦР, не имеющий мутации (дикий тип).

Таблица 2. Сравнительный анализ распределения генотипов и аллелей у больных ожирением и в контроле.

Позиция (н.о.)	Тип мутации, позиция (а.к.)	Пептид	Количество гетерозигот, частота аллеля, (95% ДИ)			χ^2 (P)
			Ожирение n=228	Контроль n=145	Женщины без ожирения n=170	
A-7341-G	Glu188Gly	γ -ЛПТ вблизи сайта протео- лиза β - МСГ	3 0,66% (0,13-1,6%)	11 3,79% (1,9-6,3%)		7,84 (0,005)
Гаплотип 1) ins 6 п.о. (GGGCCC) между 7304 и 7305 п.о. 2) G-7316-T	Ins Arg-Ala в 176 а.к. кодон Glu-180Stop	γ - ЛПТ	4 0,88% (0,23-1,9%)	0	0	
Ins 9 п.о. (AGCAGCGGC) между 6997 и 6998 п.о.	Ins Ser-Ser-Gly между 73 и 74 а.к. кодонами	16 К пептид	8 1,75% (0,34-3,2%)	13 4,48% (2,4-7,2%)		3,92 (0,048)
Гаплотип 1) C-6982-T 2) C-7285-T	Silent Silent	16 К пептид γ - ЛПТ	9 1,97% (0,92-3,5%)	6 2,07% (0,77-4,1%)		НД
C-3832-T	Silent	Сигнальный пептид	7 1,54% (0,62-2,9%)	6 2,07% (0,77-4,1%)		НД
T-7130-C	Phe118Leu	Сайт связи α -МСГ с рецептором MC4-R	1; 0,22% (0,01-0,86%)	0		
A-7367-G	Met197Val	β - МСГ	0	1; 0,34% (0,01-1,3%)		
C-7094-G	Pro106Ala	16 К пептид	0	1; 0,34% (0,01-1,3%)		

* - Позиции нуклеотидов в гене ПОМК указаны согласно [21]. НД - не достоверно, 95% ДИ - 95% доверительный интервал.

Положение мутаций и полиморфизмов в гене ПОМК

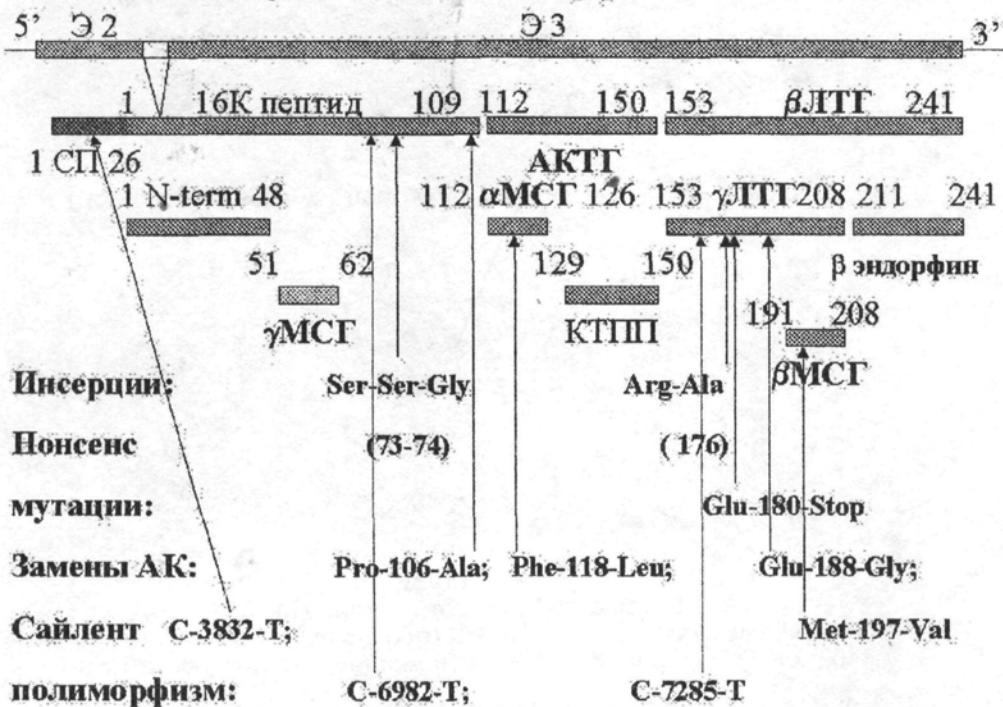


Рисунок 2.

Схематичное изображение кодирующей области гена ПОМК и производных пептидов. Э2, Э3 - экзоны. На схеме представлена нумерация в аминокислотных кодонах. Полиморфизмы и мутации показаны стрелками. Положение silent полиморфизмов обозначено номером в нуклеотидной последовательности.

Генетическое обследование членов ее семьи (рис. 4) показало, что все четыре носительницы данной мутации в гетерозиготном состоянии страдают ожирением, из них двое - с пубертатного возраста, одна - с раннего детства и самая младшая имеет избыток массы тела 15 %. У матери пробанда (I.1) помимо обнаруженной мутации в другой хромосоме обнаружен полиморфный вариант Ins Ser-Ser-Gly в области 16K пептида. У матери, сестры и дочери пробанда, имеющих мутацию и страдающих ожирением, уровень лептина в сыворотке крови оказался значительно выше (49, 20 и 12 нг/мл соответственно), чем у племянницы пробанда, имеющей генотип дикого типа (4,8 нг/мл). Уровень лептина у пробанда не исследовался, так как она находится на заместительной терапии трийодтиронином после тироедэктомии по поводу рака, что может изменять ее гормональный спектр.

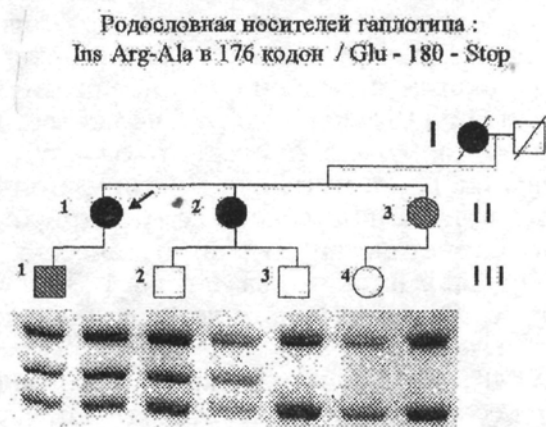
Таким образом, генетическое обследование показало, что конституционально-экзогенное ожирение в этой семье встречается только у женщин и косегрегирует с мутацией (T-7130-C; Phe118Leu) в гетерозиготном состоянии.

Кроме того, впервые нами обнаружены 2 различные замены аминокислот у двух доноров:

7) A-7367-G (Met197Val) в области β - МСГ у мужчины, не имеющего ожирения, и

8) C-7094-G (Pro106Ala) в области 16К пептида у женщины без избытка массы тела.

СКРИНИНГ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ ПРООПИОМЕЛАНОКОРТИНА У БОЛЬНЫХ ОЖИРЕНИЕМ.

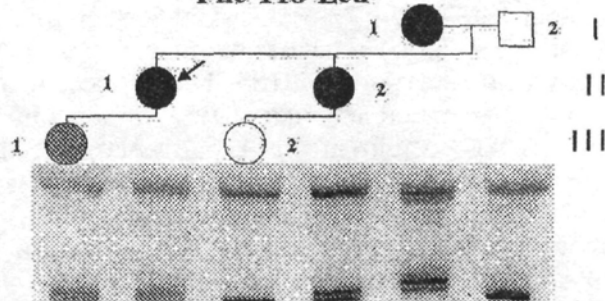


Код	Генотип	Пол	Возраст, лет	Вес, кг	Рост, см	ИМТ, кг/м ²	Анамнез по ожирению
II 1	+ / +	Ж	52	118	158	39,3	С пубертата
II 2	+ / -	Ж	52	82	136	33,7	После родов
II 3	- / -	Ж	42	85	164	31,6	Последние 5 лет
III 1	+ / +	М	28	77	177	24,8	До пубертата
III 2	+ / +	М	30	80	184	23,6	Норма
III 3	- / -	М	22	70	178	22	Норма
III 4	- / -	Ж	8	32	138	16,8	Норма

Рисунок 3.
Генотипирование родословной. Пробанд указан стрелкой.
" + " и " - " обозначают наличие и отсутствие мутации .

Родословная носителей мутации

Phe-118-Leu



Код	Генотип	Пол	Возраст, лет	Вес, кг	Рост, см	ИМТ, кг/м ²	Анамнез по ожирению
I 1	+ / -	Ж	66	87	157	35,4	С пубертата
I 2	- / -	М	68	68	170	23,5	Норма
II 1	+ / -	Ж	32	79	165	29	С детства
II 2	+ / -	Ж	39	80,9	167	29	С пубертата
III 1	+ / -	Ж	7	20	112	16	Избыток массы тела 15 %
III 2	- / -	Ж	17	53,6	164	19,9	Норма

Рисунок 4.
Генотипирование родословной. Пробанд указан стрелкой.
" + " и " - " обозначают наличие и отсутствие мутации..

Полученные в данном исследовании результаты свидетельствуют о том, что ген ПОМК имеет достаточно большое количество полиморфизмов и редких мутаций, часть из которых влияет на развитие ожирения. Семейный анализ на ассоциацию с ожирением показал, что две мутации (Ins 176:Arg-Ala /180-Stop и Phe 118 Leu) в кодирующей области гена ПОМК вызывают развитие конституционально-экзогенного ожирения у женщин с наследованием заболевания по доминантному типу, причем степень проявления заболевания при наличии данных мутаций, по-видимому, зависит также и от других генетических и эпигенетических факторов. С другой стороны, можно предполагать, что замена Glu188Gly в гене ПОМК оказывает протективное влияние, поскольку встречается в контрольной группе достоверно чаще, чем у больных.

Скрининг гена ПОМК на наличие мутаций, ассоциированных с ожирением, проводили несколько групп исследователей [22 - 24]. При обследовании 156 молодых мужчин, страдающих ожирением с детства, Echwald [23] обнаружил у разных пациентов два точечных полиморфизма в 5'- и 3'- нетранслируемых областях, два молчащих полиморфизма в кодирующей области, вставку Ser-Ser-Gly между 73 и 74 кодонами и аминокислотную замену Arg236Gln в гетерозиготном состоянии в области β -эндорфина у одного больного. Последняя замена отсутствовала в контроле (n=205). Giudice с соавторами [24] обнаружили 3 аминокислотные замены (Ser7Thr и Ser9Leu в сигнальном пептиде и Arg236Gln в области β -эндорфина) в гетерозиготном состоянии у трех из 87 итальянских детей, страдающих ранней формой ожирения, а также вставку Ser-Ser-Gly между 73 и 74 кодонами в гетерозиготном состоянии у девяти детей. Однако авторам не удалось обнаружить четкой ассоциации обнаруженных ими полиморфизмов и мутаций с фенотипом, возможно, из-за недостаточной выборки больных или отсутствия контрольной группы и семейного анализа. Hinney с соавторами обследовали 96 страдающих ожирением детей и подростков и обнаружили три вставки (73-Ser-Ser-Gly-74; 73-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-74; 176:Arg-Ala), одну нонсенс-мутацию (180-Stop) и две точечные миссенс мутации (Asp80Asn, Glu188Gly). Три из них - замена Glu188Gly и гаплотип Ins 176: Arg-Ala /180-Stop обнаружены у 16-летней девочки из ФРГ, страдающей ожирением [22]. В группе контроля (n=60) гаплотип Ins 176:Arg-Ala /180-Stop не был выявлен. Данный гаплотип пробанд унаследовала от матери, имеющей избыточную массу тела (ИМТ= 28,3 кг/м²). В нашем исследовании гаплотип Ins Arg-Ala /180-Stop присутствовал в гетерозиготном состоянии у 4 женщин из 69 пациентов (43 женщины, 26 мужчин), имеющих морбидное ожирение (ИМТ 40-53 кг/м²), что составляет 5,8 % от всей группы морбидного ожирения и 9,3% от женщин этой группы. Опрос показал, что в семьях этих пациенток многие женщины по материнской линии также имели избыточный вес или ожирение. Впервые обнаружена мутация Phe118Leu в области связывания α -МСГ с рецептором MC4-R в гетерозиготном состоянии у одной женщины, страдающей ожирением с раннего детства. Косегрегация данной мутации с ожирением в трех поколениях родословной пробанда, а также отсутствие в группе контроля (n=145) показывают явную связь мутации Phe118Leu с ожирением.

Прослеживается функциональная значимость обнаруженных нами мутаций. Сравнительный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей гена ПОМК быка, крысы, мыши и человека показывает высокую консервативность участков, кодирующих α -МСГ, β -МСГ и β -

эндорфина [25]. Аминокислота Phe118 находится в "сердцевине" последовательности (His-Phe-Arg-Trp) меланокортинов, необходимой для их биологической функции. По-видимому, замена Phe118Leu может нарушать взаимодействие α -МСГ с рецептором MC4-R и, таким образом, блокировать биологическое действие гормона.

Все биологически активные участки ПОМК фланкированы парами основных аминокислот [21], которые являются сайтами протеиназ, осуществляющих процессинг прогормона. Полиморфизм Glu188Gly локализован вблизи такой пары (K189-K190) протеолиза γ -ЛТГ с образованием β -МСГ. Можно предположить, что наличие Gly в этом положении предпочтительнее для взаимодействия субстрата с протеазой, что способствует образованию большего количества β -МСГ.

Мутация G-7316-T приводит к терминации трансляции ПОМК в положении 180 а.к. и блокирует биосинтез γ -ЛТГ, β -МСГ и β -эндорфина. Известно, что β -МСГ является лигандом MC4-R рецептора, контролирующего аппетит. Участие β -эндорфина в жировом и энергетическом обмене пока не доказано, но предполагается и исследуется [26].

Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что в гене ПОМК встречаются функционально значимые мутации, приводящие к нарушению синтеза меланокортинов и, как следствие, к развитию ожирения.

Авторы выражают благодарность всем пациентам и донорам, согласившимся принять участие в данной исследовательской работе. Авторы также благодарят М.Ю. Кириллова за помощь при выборе и приобретении праймеров и руководство лаборатории Молекулярной диагностики института ВГНКИ за предоставленную возможность использовать в данной работе ABI-310.

Исследование поддержано грантами РФФИ 01-04-48763, ИНТАС 0546.

ЛИТЕРАТУРА

1. Montague C.T., et al. (1997) Nature, **387**, 903-908.
2. Jackson R.S. et al. (1997) Nat.Genet., **16**, 303-306.
3. Strobel A., Issad T., Camoin L., Ozata M., Strosberg A.D. (1998) Nat. Genet., **18**, 213-215.
4. Clement K. et al. (1998) Nature, **392**, 398-401.
5. Krud H., Biebermann H., Luck W., Horn R., Brabant G., Gruters A. (1998) Nat. Genet., **19**, 155-157.
6. Панков Ю.А. (2000) Журнал эволюционной биохимии и физиологии, **36**, 509-514.
7. Stunkard A.J., Harris J.R., Pedersen N.L., McClearn G.E. (1990) N. Eng. J Med., **322**, 1483-1487.
8. Sorensen T.I.A., Price R.A., Stunkard A.J., Schulsinger F. (1998) BMJ., **289**, 87-90.
9. Comuzzie A.G., Allison D.B. (1998) Science, **280**, 1374-1377.
10. Chang A.C.Y., Cochet M., Cohen S.N. (1980) Proc. Nat. Acad. Sci., **77**, 4890-4894.
11. Schwartz M.W., Seeley R.J., Woods S.C., et al. (1997) Diabetes, **46**, 2119-2123.
12. Thornton J.E., Cheung C.C., Clifton D.K., Steiner R.A. (1997) Endocrinology, **138**, 5063-5066.
13. Yaswen L., Diehl N., Brennan M.B., Hochgeschwender U. (1999) Nat. Med., **5**, 1066-1070.
14. Huszar D. (1997) Cell., **88**, 131-141.
15. Ollman M.M. (1997) Science., **278**, 135-138.
16. Comuzzie A.G., Hixson J.E., Almasy L. (1997) Nat. Genet., **15**, 273-276.

17. Satoh, H., Mori, S. (1997) Cytogenet. Cell Genet., **76**, 221-222.
18. Hixson J.E., Almasy L., Cole S., Birnbaum S., Mitchell B.D., Mahaney M.C., Stern M.P., MacCluer J.W., Blangero J., Comuzzie A.G. (1999) J. Clin. Endocrinol. Metab., **84**, 3187-3191.
19. Lindblom B., Holmlund G. (1988) Gene Annal. Tech., **5**, 94-101.
20. Harvey C.B., Pratt W.S., Islam I., Whitehouse D.B., Swallow D.M. (1995) Eur J Hum Genet., **3**, 27-41.
21. Takahashi H., Hakamata Y., Watanabe Y., Kikuno R., Miyata T., Numa S. (1983) Nucl. Acids Res., **11**, 6847-6858.
22. Hinney A., Becker I., Heibull O. (1998) J. Clin. Endocrinol. Metab., **83**, 3737-3741.
23. Echwald S.M., Sorensen T.I.A., Andersen T., Tybjaerg-Hansen A., Clausen J.O., Pedersen O. (1999) Int J Obes., **23**, 293-298.
24. Giudice E.M., Cirillo G., Santoro N., D'Urso L., Carbone M.T., Toro R.D., Perrone L. (2001) Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord., **25**, 61-67.
25. Мепмеецов Н.П. (1997) Вестник РАМН, №8, 10-15.
26. Cozzolino D., Sessa G., Salvatore T., Sasso F.C., Giughiano D., Lefebvre P.J., Torella R. (1996) J. Clin. Endocrinol. Metab., **81**, 713-718.

Поступила 18.01.01.

THE MUTATION SCREENING OF PROOPIOMELANOCORTIN GENE RELATED TO HUMAN OBESITY

**YU.A. Pankov¹, S.B. Yatcishina^{1,2}, S.K. Karpova¹, M.K. Chekbranova¹,
YU. P. Popova³, O.N. Grigorvan³, E.I. Rogaev².**

1-Endocrine Research Centre of RAMN, 115478, Moscow, Moscovrechye str, 1, Russian Federation, E mail: yuri-pankov@mtu-net.ru

2-Scientific Centre of Psychiatric Health of RAMS, 113152, Moscow, E mail: rogaev@dol.ru

3-Institute of Nutrition of RAMS, 109240 Moscow, fax: (095)-113-87-00

Proopiomelanocortin (POMC) is a precursor of ACTH, β - and γ -lipotropins, α -, β - and γ -MSH, β -endorphin. α -, β - and γ -MSH are synthesized by hypothalamus neurons, and leptin stimulates their synthesis. These hormones regulate food consumption and energy metabolism by via melanocortin receptors (MC3-R and MC4-R) in hypothalamus. Screening mutations in the coding region of human POMC has been carried out with PCR, SSCP and DNA sequencing and the association study of these mutations and human obesity has been performed. Group of patients with the exogenous obesity (BMI 37.8 ± 6.8 kg/m²) consisted of 228 persons (173 women and 55 men). 145 blood donors (67 women and 78 men) without obesity (BMI 25 kg/m², 23.1 ± 2.2 kg/m²) and 170 women without apparent obesity at the beginning of the study were included in the control group. 8 polymorph sites: insertions; missense and silent mutations have been identified in the coding region of POMC. Among them 1) two heterozygous mutations: the insertion of 6 b.p. (GGGCCC) in codon 176 inducing the insertion of two amino acid residues (Arg-Ala) in POMC and nonsense mutation (G-7316-T) in codon 180 of γ -LTH coding region of the same DNA chain were identified in 4 women (5.8%) out of 69 patients with morbid obesity (BMI 40 - 53 kg/m²). These mutations were not found in control (n=315). 2) The new heterozygous mutation T-7130-C (Phe118Leu) in active site of α -MSH has been identified in POMC gene of a woman suffering with obesity since the early childhood. 3) Mutation A-7341-G (Glu188Gly) seemed to have a protective effect because it was revealed more frequently in control (3.9 %) than in obese patients (0.66%). The results of genetic study of two pedigrees suggested the dominant influence of the first two mutations (1 and 2) on woman obesity.

Key words: obesity, proopiomelanocortin gene, mutation analysis.