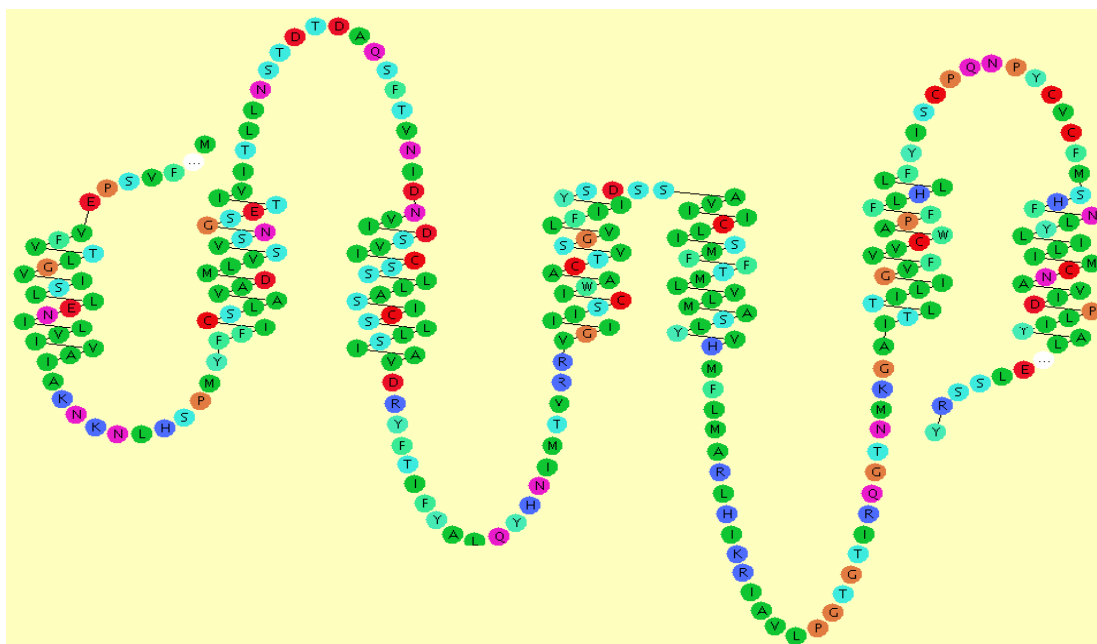


ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ 4 ΤΗΣ ΜΕΛΑΝΟΚΟΡΤΙΝΗΣ ΣΕ ΠΑΧΥΣΑΡΚΑ ΠΑΙΔΙΑ

ΤΑΣΙΟΠΟΥΛΟΥ ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ

A.M.9959



Επιβλέπων : Δεδούσης Γεώργιος, Λέκτορας

Τριμελής Επιτροπή : Δεδούσης Γεώργιος, Λέκτορας

Συντώσης Λάμπρος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Γιαννακούρης Νικόλαος, Λέκτορας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κύριο Γιώργο Δεδούση για την βοήθεια και τις πολύτιμες υποδείξεις του καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας μελέτης. Οφείλω να τον ευχαριστήσω θερμά και για την εμπιστοσύνη και κατανόηση του σε μία δύσκολη περίοδο των σπουδών μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δέσποινα Χουμεριανού και την Ειρήνη Λουίζου για τη βοήθεια τους κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους της μελέτης και την αμέριστη συμπαράσταση που μου παρείχαν σε όλο αυτό το διάστημα.

Τέλος, ευχαριστώ τη Λέκτορα κ. Αδαμαντία Κυριακού και όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Βιολογίας, Βιοχημείας και Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών για τη φιλοξενία, την κατανόηση και τη βοήθεια τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	4
1.1. Γενικά για την παχυσαρκία.....	5
1.2. Γενετική βάση της παχυσαρκίας.....	6
1.3. Μονογονιδιακές μορφές παχυσαρκίας.....	7
1.4. Μελανοκορτίνες.....	10
1.5. Δράσεις των μελανοκορτινών.....	11
1.6. Υποδοχείς μελανοκορτινών.....	12
1.7. Ρόλος των υποδοχέων μελανοκορτινών στη ρύθμιση του σωματικού βάρους.....	15
1.8. Αλληλεπίδραση των μελανοκορτινών με άλλους μηχανισμούς ρύθμισης πρόσληψης τροφής.....	18
1.9. Υποδοχέας MC4R.....	19
1.10. Γονίδιο του υποδοχέα του MC4R.....	23
1.11. Μεταλλάξεις στο γονίδιο του υποδοχέα MC4R.....	23
1.12. Λειτουργική σημασία των μεταλλάξεων στο γονίδιο του υποδοχέα MC4R.....	30
1.13. Φαινοτυπικές και κλινικές εκδηλώσεις.....	35
1.14. Υποδοχέας MC4R και διαταραχές λήψης τροφής.....	35
1.15. Προοπτικές φαρμακολογικής αντιμετώπισης της παχυσαρκίας μέσω της δράσης του υποδοχέα MC4R.....	36
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	37
2.1. Σκοπός.....	38
2.2. Υλικά και μέθοδοι.....	38
2.3. Αποτελέσματα.....	48
3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	53
4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	56
5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	61

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το φαινόμενο της παχυσαρκίας και οι βλαβερές συνέπειες του στην ανθρώπινη υγεία αποτελούν σήμερα αντικείμενο παγκόσμιας ανησυχίας. Οι επιστημονικές γνώσεις σχετικά με τα αίτια της παχυσαρκίας έχουν πολλαπλασιαστεί τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερα όσον αφορά στη γενετική της βάση. Έως σήμερα έχουν εντοπιστεί 50 περίπου γονίδια που σχετίζονται με την εμφάνιση παχυσαρκίας και τα οποία εμπλέκονται είτε στη ρύθμιση της μεταβολικής λειτουργίας, είτε στη ρύθμιση της πρόσληψης τροφής. Είναι πλέον γνωστό ότι στη διατήρηση της ενεργειακής ομοιόστασης του οργανισμού αλληλεπιδρούν διαφορετικοί μηχανισμοί, μεταξύ των οποίων είναι και το σύστημα των μελανοκορτινών και των υποδοχέων τους. Ο υποδοχέας 4 των μελανοκορτινών συγκεντρώνει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον καθώς από τις μέχρι τώρα έρευνες φαίνεται ότι μεταλλάξεις στο αντίστοιχο γονίδιο μπορεί να ευθύνονται για ποσοστά παχυσαρκίας από 0.5 έως και 6% παγκοσμίως. Η απόκτηση περαιτέρω γνώσεων για την ακριβή λειτουργία και το μηχανισμό δράσης του υποδοχέα αυτού πιθανόν να ανοίξει μελλοντικά το δρόμο και για τη φαρμακολογική αντιμετώπιση ορισμένων μορφών παχυσαρκίας.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο του υποδοχέα της μελανοκορτίνης 4 (MC4R) σε δείγμα ελλήνων παχύσαρκων παιδιών, με τη χρήση της τεχνικής DGGE (ηλεκτροφόρηση κλίσης με αποδιατακτικούς παράγοντες). Για το δείγμα των ατόμων που μελετήθηκε δεν ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις στο τμήμα του γονιδίου MC4R που εξετάστηκε. Η ανίχνευση μεταλλάξεων στον ελληνικό πληθυσμό παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον και χρήζει περαιτέρω έρευνας στο μέλλον.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ

Το φαινόμενο της παχυσαρκίας αποτελεί σημαντικό πρόβλημα στις σημερινές κοινωνίες και τείνει συνεχώς αυξανόμενο, συμβάλλοντας αποδεδειγμένα στην εμφάνιση πολλών χρόνιων νόσων. Η παχυσαρκία έχει πλέον αναγνωριστεί ως ο υπ' αριθμόν ένα παράγοντας που συμβάλλει στην εκδήλωση νόσων όπως τα καρδιαγγειακά, ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπέρταση, διάφοροι τύποι καρκίνου κ.α..

Εκτιμάται ότι τα τελευταία χρόνια περίπου 300.000 θάνατοι στις ΗΠΑ οφείλονται στην παχυσαρκία, πάνω από το μισό του συνολικού πληθυσμού είναι υπέρβαρο ή παχύσαρκο και ότι τα ποσοστά παχυσαρκίας έχουν αυξηθεί κατά 50% την τελευταία μόνο δεκαετία (Cone, 2003). Ακόμα περισσότερο ανησυχητικό είναι το γεγονός ότι η παχυσαρκία πλήττει όλο και περισσότερο παιδιά και εφήβους προοιωνίζοντας μια ραγδαία αύξηση των νόσων που σχετίζονται με αυτή. Έχει αποδειχθεί ότι ενήλικες που ήταν παχύσαρκοι σε παιδική ηλικία εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσοστά νοσηρότητας ακόμα και αν δεν παραμείνουν παχύσαρκοι κατά την ενηλικίωση τους.

Ως παχυσαρκία ορίζεται η συσσώρευση σωματικού λίπους σε βαθμό που μπορεί να αποτελέσει αιτία για βλάβες στην ανθρώπινη υγεία. Η υπερβολική συσσώρευση λίπους στον οργανισμό οφείλεται στο μη ισορροπημένο ισοζύγιο ενέργειας το οποίο προσλαμβάνει και καταναλώνει ένα άτομο και είναι συνήθως αποτέλεσμα μίας μακράς περιόδου κατά την οποία η πρόσληψη ενέργειας υπερβαίνει ελαφρά την κατανάλωση. Αίτια της παχυσαρκίας είναι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η διατροφή και η μειωμένη φυσική δραστηριότητα, υπάρχει όμως και σημαντική γενετική βάση.

Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο κριτήριο για το χαρακτηρισμό ενός ατόμου ως παχύσαρκο είναι ο Δείκτης Μάζας Σώματος (ΔΜΣ), βάσει των τιμών του οποίου ορίζονται οι διάφορες μορφές παχυσαρκίας. Ο ΔΜΣ είναι μια εύχρηστη μέθοδος και ορίζεται ως το πηλίκο του βάρους προς το τετράγωνο του ύψους εκφρασμένα αντίστοιχα σε χιλιόγραμμα και εκατοστά του μέτρου. Οι τιμές του ΔΜΣ διαφοροποιούνται μεταξύ αντρών και γυναικών. Στην καθημερινή πρακτική, τιμές του

ΔΜΣ που υπερβαίνουν τα 28 kg/m^2 συνδέονται με αυξημένα ποσοστά νοσηρότητας, ενώ τιμές πάνω από 30 kg/m^2 κατατάσσουν τους ενήλικες στους παχύσαρκους.

Ειδικότερα κριτήρια έχουν οριστεί όσον αφορά στις βλαβερές συνέπειες της παχυσαρκίας στην υγεία, τα οποία σχετίζονται με την κατανομή του λιπώδους ιστού του σώματος. Η συσσώρευση λίπους στην ενδοκοιλιακή χώρα η οποία απαντάται συνήθως στους άντρες, συνδέεται με την ανάπτυξη σοβαρών ασθενειών όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Αντίθετα, ο "γυναικείος" τύπος που οφείλεται σε υποδόρια συσσώρευση λίπους στο κατώτερο τμήμα του σώματος θεωρείται ότι δεν παρουσιάζει μεγάλο κίνδυνο για την υγεία.

Για τα παιδιά και τους εφήβους η διάγνωση και κατάταξη στην κατηγορία των παχύσαρκων παρουσιάζει μεγαλύτερες δυσκολίες. Όπως είναι αναμενόμενο, οι οριακές τιμές του ΔΜΣ για τη διάγνωση της παιδικής και εφηβικής παχυσαρκίας εξαρτώνται από το φύλο και την ηλικία και στην περίπτωση αυτή η κατάταξη γίνεται βάση καμπυλών.

1.2. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑΣ

Όπως αναφέρθηκε, η εμφάνιση της παχυσαρκίας έχει γενετική βάση η οποία θεωρείται ότι αγγίζει ποσοστό έως και 70%. Το γενετικό προφίλ που συμβάλλει στην συσσώρευση σωματικού λίπους θεωρείται ότι είναι αποτέλεσμα της επιλογής για γονίδια που επέτρεπαν στον άνθρωπο την όσο δυνατόν καλύτερη αποθήκευση ενέργειας όταν ζούσε για εκτεταμένες χρονικές περιόδους υπό συνθήκες όπου η εξεύρεση της τροφής ήταν δύσκολη ("thrifty genes hypothesis"). Στις σημερινές κοινωνίες όπου υπάρχει υπερεπάρκεια τροφίμων και όπου η φυσική δραστηριότητα είναι σημαντικά μειωμένη σε σχέση με τη δραστηριότητα των προγόνων μας, ο γονότυπος αυτός οδηγεί σε ανάπτυξη παχυσαρκίας με βλαβερές συνέπειες.

Έως σήμερα έχουν συσχετισθεί με τη ρύθμιση του σωματικού βάρους περίπου 50 γονίδια. Η σημερινή επιτυχής αναγνώριση και ταυτοποίηση τέτοιων "ύποπτων" γονιδίων στο ανθρώπινο γονιδίωμα είναι αποτέλεσμα διαφορετικών προσεγγίσεων που ακολουθούνται από τους επιστήμονες. Μια προσέγγιση αποτελούν ορισμένες μελέτες

ευρείας κλίμακας οι οποίες στοχεύουν στην αναγνώριση περιοχών του γονιδιώματος που πιθανόν να συνδέονται με την παχυσαρκία. Έως σήμερα έχουν συσχετισθεί με την παχυσαρκία 59 τόποι του ανθρώπινου γονιδιώματος, που εδράζονται σε όλα τα χρωμοσώματα εκτός από το Υ.

Εναλλακτικά, ερευνάται ο ρόλος συγκεκριμένων αλληλομόρφων ενός "ύποπτου" γονιδίου στην εμφάνιση παχυσαρκίας, είτε σε μέλη της ίδιας οικογένειας που συνδέονται με συγγένεια εξ' αίματος είτε σε τυχαία επιλεγμένους πληθυσμούς (Clement & Ferri, 2003). Ως "ύποπτα" γονίδια μπορεί να χαρακτηριστούν γονίδια που εμπλέκονται στην πρόσληψη τροφής (π.χ. γονίδιο της λεπτίνης) ή στο μεταβολισμό (π.χ. γονίδιο της ινσουλίνης) των θρεπτικών συστατικών.

Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η παχυσαρκία οφείλεται στην αλληλεπίδραση περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων, οι οποίοι δρουν με τη συμμετοχή περισσότερων του ενός γονιδίων. Πρόκειται λοιπόν για μια πολυγονιδιακή νόσο, στην εμφάνιση της οποίας συμμετέχουν περισσότερα από ένα γονίδια, συμβάλλοντας το καθένα κατά ένα μικρό ποσοστό. Αντίθετα, οι μονογονιδιακές μορφές της παχυσαρκίας, σύμφωνα με τις μέχρι τώρα απόψεις, είναι σχετικά σπάνιες και ευθύνονται για το μικρότερο ποσοστό των παχύσαρκων ατόμων. Πρόσφατες μελέτες όμως έδειξαν ότι ορισμένα γονίδια είναι δυνατόν να καθορίζουν την εμφάνιση παχυσαρκίας σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι ήταν πιστευτό μέχρι σήμερα. Η εμφάνιση υπερβολικής παχυσαρκίας στον άνθρωπο έχει συνδεθεί με τουλάχιστον 6 διαφορετικά γονίδια που προκαλούν σπάνιες πολλαπλές μεταλλάξεις με διαφορετική διεισδυτικότητα σε μεγάλα τμήματα γονιδίων παρά σε αθροιστικότητα και αλληλεπίδραση ενός περιορισμένου αριθμού συχνά απαντούμενων αλληλομόρφων (Lubrano-Berthelier *et.al.*, 2003).

1.3. ΜΟΝΟΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑΣ

Τα πρώτα βήματα στην προσπάθεια των επιστημόνων να αναγνωριστούν τα γονίδια που σχετίζονται με την παχυσαρκία έγιναν με βάση παρατηρήσεις σε παχύσαρκα άτομα αλλά και μελέτες σε πειραματόζωα. Τα αποτελέσματα των ερευνών αυτών έδωσαν τις πρώτες ενδείξεις για τα πιθανά εμπλεκόμενα γονίδια και τα προϊόντα που

κωδικοποιούν, αλλά και για τους μηχανισμούς που ελέγχουν την πρόσληψη τροφής και το ενεργειακό ισοζύγιο.

Είναι γνωστά περίπου 25 γενετικά σύνδρομα τα οποία συνοδεύονται από την εμφάνιση παχυσαρκίας, αλλά μόνο λίγα από τα γονίδια που ευθύνονται για τα σύνδρομα αυτά έχουν αναγνωριστεί. Από τα περισσότερο μελετημένα είναι το σύνδρομο Prader-Willi που εκδηλώνεται με παχυσαρκία, υπερφαγία, υπογοναδισμό, πνευματική καθυστέρηση και σωματικές ανωμαλίες. Άλλα τέτοια γνωστά γενετικά σύνδρομα είναι τα Bardet-Biedl, Alstrom και Cohen.

Το πρώτο γονίδιο το οποίο βρέθηκε να σχετίζεται με τη ρύθμιση της πρόσληψης τροφής είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί τη λεπτίνη. Η λεπτίνη είναι ένα πολυπεπτίδιο που παράγεται από τον λιπώδη ιστό σε επίπεδα ανάλογα με τον αριθμό και το μέγεθος των λιποκυττάρων. Στη συνέχεια εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος και μεταφέρεται στον υποθάλαμο όπου και δεσμεύεται στους αντίστοιχους υποδοχείς λεπτίνης. Η πρωτεΐνη αυτή είναι ουσιαστικά ένα σήμα μέσω του οποίου ενημερώνεται το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) για τα ποσοστά λίπους του σώματος.

Σε παρατηρήσεις που έγιναν αρχικά σε ποντίκια, όσα από αυτά έφεραν μεταλλάξεις που οδηγούσαν σε έλλειψη λεπτίνης ή σε ανωμαλίες του υποδοχέα, χαρακτηρίζονταν από συγκεκριμένα γνωρίσματα όπως η αυξημένη όρεξη, ο μειωμένος ενεργειακός μεταβολισμός και διαταραχές του ενδοκρινικού και μεταβολικού συστήματος. Ανάλογο γονίδιο αναγνωρίστηκε και στους ανθρώπους, και με χορήγηση λεπτίνης επετεύχθη η μείωση του σωματικού βάρους παχύσαρκων ατόμων που έπασχαν από ανεπάρκεια η οποία οφειλόταν σε μεταλλάξεις. Εντούτοις, σε κλινικές μελέτες όπου παχύσαρκοι με φυσιολογικά επίπεδα λεπτίνης λάμβαναν λεπτίνη σε αυξημένες ποσότητες, τα ποσοστά απώλειας βάρους ποίκιλλαν. Ο ρόλος της λεπτίνης και του υποδοχέα λεπτίνης στη ρύθμιση της ενεργειακής ισορροπίας είναι σήμερα αναγνωρισμένος. Παρότι η δράση της λεπτίνης σχετίζεται σαφώς με την εμφάνιση της παχυσαρκίας, στις περισσότερες περιπτώσεις όμως η παρουσία της δεν αρκεί για την ρύθμιση του σωματικού βάρους.

Το γονίδιο PPAR γ 2 (Peroxisome proliferator-activated receptor γ 2) που κωδικοποιεί τον αντίστοιχο υποδοχέα, είναι γνωστό ότι εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων και στη δράση της ινσουλίνης. Την ενεργοποίηση του PPAR γ 2 προκαλούν άγνωστοι έως τώρα ενδογενείς ενώσεις, ενώ η ινσουλίνη και ορισμένοι αυξητικοί παράγοντες παρεμποδίζουν τη δράση του. Μετάλλαξη στο γονίδιο αυτό έχει εντοπιστεί σε 3 παχύσαρκους άνδρες που έπασχαν από σακχαρώδη διαβήτη τύπου II καθώς και σε μία παχύσαρκτη μη διαβητική γυναίκα. Η μετάλλαξη αυτή φαίνεται ότι έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη δράση του γονιδίου καθώς επάγει τη συσσώρευση τριγλυκεριδίων όταν εκφραστεί σε κυτταροκαλλιέργειες. Ο ακριβής ρόλος του γονιδίου αυτού στους ανθρώπους μένει να εξακριβωθεί.

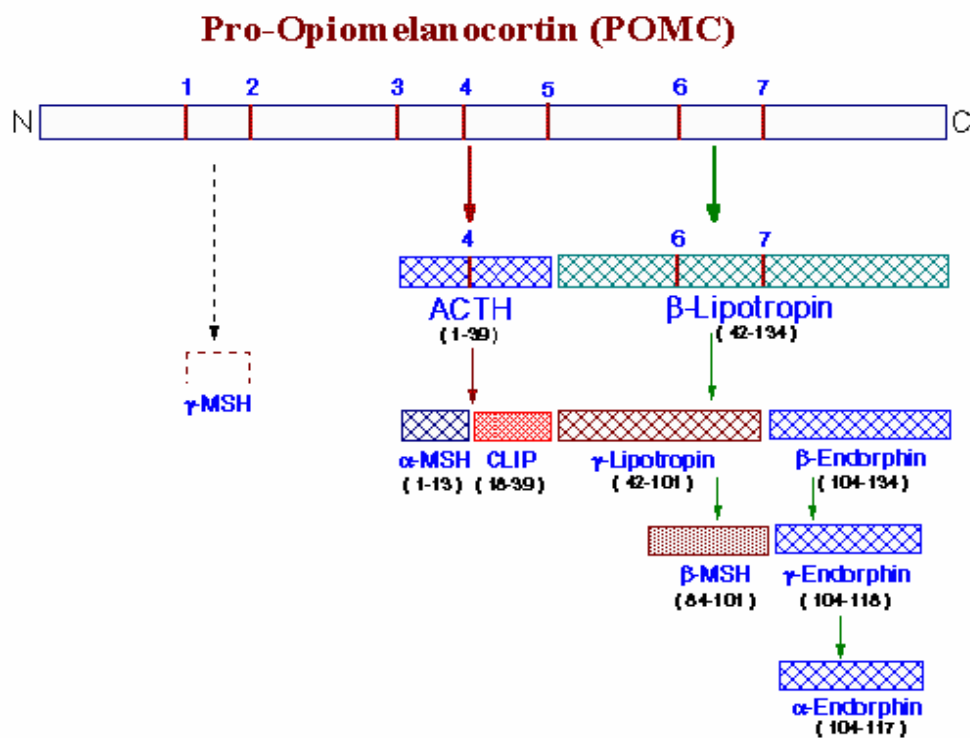
Άλλες μονογονιδιακές μορφές παχυσαρκίας οφείλονται σε γονίδια τα οποία ελέγχουν τη δράση του συστήματος των μελανοκορτινών και ρυθμίζουν την πρόσληψη τροφής. Το σύστημα αυτό απαρτίζεται από μια οικογένεια βιοενεργών πεπτιδίων που προκύπτουν από την προορμόνη προπιομελανοκορτίνη και ονομάζονται μελανοκορτίνες, τους αντίστοιχους υποδοχείς μέσω των οποίων δρουν, καθώς και από τους ενδογενείς ανταγωνιστές τους (Cone, 2003).

Μεταλλάξεις στο γονίδιο της προπιομελανοκορτίνης έχουν εντοπιστεί σε άτομα που έπασχαν από πρόωμη έναρξη παχυσαρκίας και υπερφαγία. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η μελέτη του γονιδίου που κωδικοποιεί το ένζυμο προορμόνη της κομβερτάσης, το οποίο μεσολαβεί για τη μετατροπή της προορμόνης προπιομελανοκορτίνη στις παράγωγες τις μελανοκορτίνες.

Τη μεγαλύτερη προσοχή συγκεντρώνει το γονίδιο του υποδοχέα της μελανοκορτίνης 4 (Melanocortin Receptor 4 - MC4R), το οποίο συνδέεται με την έναρξη εμφάνισης πρόωμης παχυσαρκίας σε νεαρές ηλικίες. Θεωρείται ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό ευθύνονται για ένα σχετικά μεγάλο ποσοστό παχυσαρκίας (0.5-6%) και μπορεί να αυξήσουν έως και 100 φορές τις πιθανότητες εμφάνισης της. Συμπληρωματική δράση με αυτή του MC4R στην ενεργειακή ομοιόσταση φαίνεται να έχει ο υποδοχέας MC3.

1.4. ΜΕΛΑΝΟΚΟΡΤΙΝΕΣ

Οι μελανοκορτίνες ανήκουν σε μια οικογένεια βιοενεργών πεπτιδίων που αποτελούν παράγωγα της προοπιμελανοκορτίνης (POMC) και εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα στη δομή τους. Σε αυτές περιλαμβάνονται οι τέσσερις από τις 7 παράγωγες ενώσεις της προοπιμελανοκορτίνης, και συγκεκριμένα η αδρενοκορτικοτρόπος (ACTH) ή φλοιοτρόπος ορμόνη και οι α -, β - και γ - μελανοτροπίνες (α -, β -, γ -MSH). Οι μελανοκορτίνες πήραν το όνομα τους εξαιτίας της αρχικής ανακάλυψης της δράσης της α -MSH στα μελανοσώματα. Στα παράγωγα της προοπιμελανοκορτίνης ανήκουν επίσης το πεπτίδιο CLIP, (Corticotropin-like intermediate lobe peptide), η β -λιποτροπίνη (β -LPH) και η β -ενδορφίνη. Τα πεπτίδια αυτά συντίθενται σε διάφορα σημεία του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) και σε περιφερικούς ιστούς όπως ο γαστρεντερικός σωλήνας, ο πλακούντας και το πάγκρεας, και παίρνουν μέρος στη ρύθμιση πολλών φυσιολογικών λειτουργιών.



Εικόνα Error! Unknown switch argument.. Η διαδικασία μετατροπής της προοπιμελανοκορτίνης στα παράγωγα της πεπτίδια.

Η διαδικασία μετατροπής της προοπιμελανοκορτίνης στα παράγωγα της γίνεται με εξειδικευμένο τρόπο στους διάφορους ιστούς και είναι αποτέλεσμα της δράσης των πρωτεολυτικών ενζύμων προκονβεργτάση-1 (proconvertase-1) και προκονβεργτάση-2. Η προκονβεργτάση-1 καταλύει τη μετατροπή της προοπιμελανοκορτίνης σε ACTH, β-LPH, από τα οποία προκύπτουν στη συνέχεια τα πεπτίδια α-MSH και CLIP, β-MSH και β-ενδορφίνη αντίστοιχα μέσω της προκονβεργτάσης-2. Τέλος, η γ-MSH προκύπτει από το αμινοξυτελικό άκρο του πεπτιδίου της προοπιμελανοκορτίνης.

1.5. ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΜΕΛΑΝΟΚΟΡΤΙΝΩΝ

Οι μελανοκορτίνες συμμετέχουν στη ρύθμιση πολλών φυσιολογικών λειτουργιών. Αρχικά αναγνωρίστηκε η ικανότητα των μελανοκορτινών να επάγουν τη σύνθεση ευμελανίνης στα μελανοκύτταρα και να καθορίζουν το χρωματισμό των μαλλιών. Ενδείξεις για τη συμμετοχή των μελανοκορτινών σε άλλες φυσιολογικές λειτουργίες προήλθαν από την παρατήρηση ότι μεταλλάξεις που αναστέλλουν την έκφραση του γονιδίου POMC, είχαν σαν συνέπεια ανεπάρκεια των επινεφριδίων, παχυσαρκία και κόκκινα μαλλιά.

Όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια, οι μελανοκορτίνες ρυθμίζουν την πρόσληψη της τροφής, την ενεργειακή ομοιόσταση, την παραγωγή λίπους στους υποδόριους αδένες και επάγουν τη λιπόλυση. Επιδρούν επίσης στη λειτουργία των επινεφριδίων και την παραγωγή στεροειδών ορμονών. Δρουν σαν ενδογενείς αντιπυρετικοί παράγοντες και έχουν συστηματική και τοπική αντιφλεγμονώδη δράση. Λαμβάνουν μέρος στον έλεγχο του καρδιαγγειακού συστήματος, τη ρύθμιση της θερμοκρασίας του σώματος, την αντοχή στον πόνο και τη νατριούρηση. Επηρεάζουν την έκκριση άλλων ενώσεων που σχετίζονται με το αναπαραγωγικό σύστημα και τον τοκετό, όπως η προλακτίνη και η ωχρινότροπος ορμόνη, καθώς και τη λειτουργία και των όρχεων.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μελανοκορτίνες φαίνεται να επιδρούν και στην ικανότητα μάθησης, την συμπεριφορά, τη μνήμη και τη διαδικασία αναγέννησης των νευρικών κυττάρων. Από έρευνες σχετικά με τη δράση των μελανοκορτινών στα νευρικά κύτταρα φαίνεται ότι οι μελανοκορτίνες είτε δρουν στις συνάψεις, παρεμποδίζοντας την μετασυναπτική αγωγή του μηνύματος είτε μειώνοντας το ρυθμό εκπόλωσης στις μεμβράνες των νευρικών κυττάρων (MacNeil *et.al.*, 2000).

1.6. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΜΕΛΑΝΟΚΟΡΤΙΝΩΝ

Οι φυσιολογικές δράσεις των μελανοκορτινών μεθοδεύονται μέσω της ενεργοποίησης των αντίστοιχων υποδοχέων τους (Melanocortine Receptors-MCR's). Ο χαρακτηρισμός των υποδοχέων των μελανοκορτινών επέφερε μεγάλη πρόοδο για την κατανόηση των βιολογικών δράσεων των μελανοκορτινών. Έχουν αναγνωριστεί συνολικά 5 υποδοχείς μελανοκορτινών (MCR1- MCR5) οι οποίοι διαφέρουν όσον αφορά στην κατανομή τους και στην ικανότητα τους να αποκρίνονται στους ενδογενείς αγωνιστές (ACTH, α -, β - και γ -MSH) και ανταγωνιστές τους (agouti-signaling protein και agouti-related protein).

Η παρουσία του υποδοχέα MC1R αναγνωρίστηκε αρχικά σε κύτταρα μελανώματος, εκφράζεται όμως και σε φυσιολογικά μελανοκύτταρα και κερατινοκύτταρα, όπου δρα ρυθμίζοντας το χρωματισμό του δέρματος και του τριχώματος αντίστοιχα. Επίσης εκφράζεται στα μακροφάγα όπου επιδρά στη λοιμογόνο απόκριση, καθώς και σε άλλους περιφερειακούς ιστούς. Ο υποδοχέας MC2R εκφράζεται στην υπόφυση και ευθύνεται για τη στεροειδογένεση, ενώ υπάρχει και στα κύτταρα του λιπώδη ιστού όπου παίζει ρόλο στη λιπογένεση. Οι υποδοχείς MC3R και MC4R εκφράζονται σε διάφορα τμήματα του εγκεφάλου και σχετίζονται με τη ρύθμιση της ενεργειακής ομοιόστασης. Επιπλέον ο υποδοχέας MC3R υπάρχει και σε περιφερειακούς ιστούς όπως πλακούντας, στομάχι, δωδεκαδάκτυλο, πάγκρεας, καρδιά και σε μικρότερες ποσότητες στους μύες και τα νεφρά. Ο MC4R μπορεί να διαχωριστεί από τον MC3R από την ιδιότητα του να ενεργοποιείται 100 φορές ευκολότερα από την α -MSH σε σχέση με τη γ -MSH, ενώ η δράση των δύο ενώσεων δε διαφέρει για τον υποδοχέα MC3R. Ο υποδοχέας MC5R εκφράζεται σε πολλά όργανα αλλά υπάρχει σε περιορισμένο βαθμό και στον εγκεφαλο όπου ο ρόλος του δεν είναι γνωστός.

Για το ίδιο είδος θηλαστικού η ομολογία για τους αντίστοιχους υποδοχείς κυμαίνεται από 75-94%, με πιο συντηρημένη την περιοχή του υποδοχέα MCR4 και λιγότερο συντηρημένη εκείνη του MCR1.

Στον άνθρωπο, οι υποδοχείς παρουσιάζουν ομοιότητα στη δομή τους που κυμαίνεται από 42-67%, με ποσοστά ομοιότητας περίπου 60% μεταξύ MC4R και MC5R, 45% μεταξύ MC3R - MC1R και MC3R -MC2R, και 38% μεταξύ MC2R και MC4R. Ο

MC4R μοιάζει δομικά περισσότερο με τον MC3R και είναι πανομοιότυπος με αυτόν κατά 58% στη σύνθεση των αμινοξέων. Επιπλέον αξίζει να σημειωθεί ότι οι υποδοχείς των μελανοκορτινών είναι οι υποδοχείς που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ομοιότητα με τους υποδοχείς κανναβινοειδών.

Υποδοχέας	Σημεία έκφρασης	Αγωνιστές	Ανταγωνιστές	Λειτουργία
MC1R	Μελανοκύτταρα, ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, ενδοθήλιο, κύτταρα Sertoli	α -MSH = ACTH> β -MSH> γ -MSH	ASP	Χρωματισμός δέρματος, αντι-λοιμογόνος δράση
MC2R	Υπόφυση, λιποκύτταρα	ACTH		Στεροειδογένεση, λιπογένεση
MC3R	Υποθάλαμος, ιππόκαμπος, παρεγκεφαλίδα, φλοιός, πλακούντας, στομάχι, δωδεκαδάκτυλο, πάγκρεας	α -MSH = β -MSH = γ -MSH = ACTH	AGRP	Ρύθμιση σωματικού βάρους, αναπαραγωγή, καρδιαγγειακή λειτουργία
MC4R	Φλοιός, θάλαμος, υποθάλαμος, εγκεφαλικό στέλεχος	α -MSH = ACTH> β -MSH> γ -MSH	AGRP, ASP	Ρύθμιση σωματικού βάρους
MC5R	Εξωκρινείς αδένες, υποδόριοι αδένες, σκελετικοί μύες, λιποκύτταρα	α -MSH > ACTH= β -MSH>> γ -MSH	AGRP	Έκκριση υποδόριων αδένων

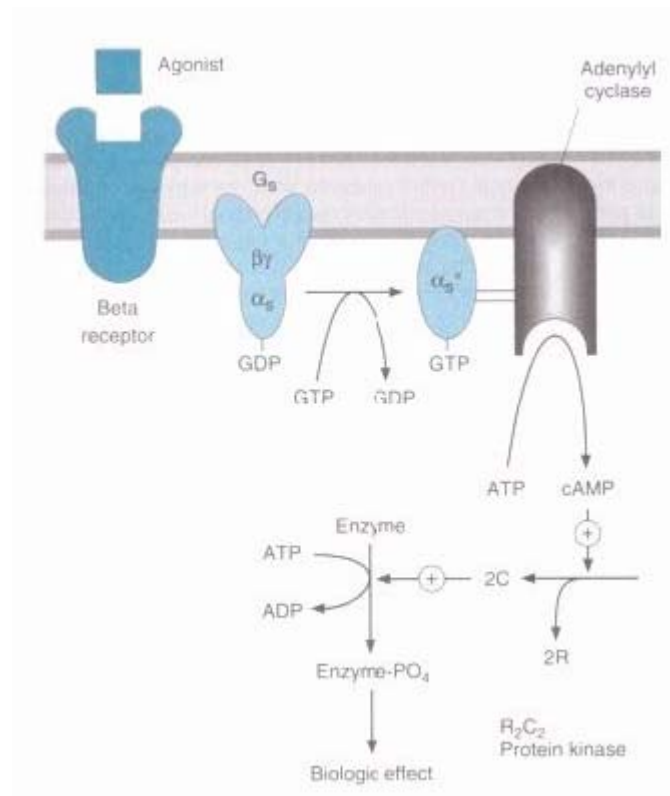
ASP: Agouti-signaling protein, AGRP: Agouti-related protein

Πίνακας Error! Unknown switch argument.. Υποδοχείς μελανοκορτινών, σημεία έκφρασης, αγωνιστές, ανταγωνιστές και ο λειτουργικός τους ρόλος.

Οι υποδοχείς των μελανοκορτινών ανήκουν στην κατηγορία των υποδοχέων που δρουν μέσω της σύνδεσης τους με πρωτεΐνες G και είναι μεταξύ των μικρότερων σε μέγεθος G-συνδεδεμένων υποδοχέων (296-361 αμινοξέα) (MacNeil *et.al*, 2002). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν πολλοί υποδοχείς, οι οποίοι συνδέονται με μία ή περισσότερες πρωτεΐνες στην εσωτερική (κυτοσολική) πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης και είναι γνωστές με τον όρο "υπεροικογένεια των πρωτεϊνών G".

Και οι 5 μορφές των υποδοχέων είναι συνδεδεμένες λειτουργικά με την αδενική κυκλάση και οι επιδράσεις τους οφείλονται στην ενεργοποίηση της βιοχημικής οδού του κυκλικού AMP (cAMP). Πιο αναλυτικά, η δέσμευση του πρώτου μηνύματος επιφέρει μεταβολές στη διαμόρφωση του μεμβρανικού υποδοχέα οι οποίες προκαλούν

τη σύνδεση ενός εκ των τριών υπομονάδων της πρωτεΐνης G σε μια άλλη παρακείμενη κυτταροπλασματική πρωτεΐνη (εκτελεστική ή τελεστική) μέσω της οποίας τελικά πραγματοποιείται η κυτταρική απόκριση.



Εικόνα Error! Unknown switch argument.. Ενεργοποίηση της οδού της αδενυλικής κυκλάσης μέσω των υποδοχέων της υπερικογένειας των πρωτεϊνών G .

Οι υποδοχείς των μελανοκορτινών οδηγούν στην ενεργοποίηση της εκτελεστικής πρωτεΐνης που ονομάζεται αδενυλική κυκλάση, η οποία στη συνέχεια καταλύει τη μετατροπή μερικών μορίων κυτοσολικού ATP σε 3', 5'-κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (κυκλικό AMP, cAMP). Στη συνέχεια το cAMP δρα σαν δεύτερο μήνυμα εκκινώντας την ακολουθία γεγονότων που προκαλούν την τελική απόκριση του κυττάρου ως προς το πρώτο μήνυμα. Συγκεκριμένα το cAMP ενεργοποιεί το ευαίσθητο σε αυτή ένζυμο αδενυλοεξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση (ή πρωτεϊνική κινάση A), η οποία φωσφορυλιώνει άλλες πρωτεΐνες (ένζυμα) μεταβάλλοντας τη δραστηριότητά τους, με αποτέλεσμα την τελική απόκριση στο αρχικό μήνυμα.

1.7. ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΜΕΛΑΝΟΚΟΡΤΙΝΩΝ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΣΩΜΑΤΙΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ

1.7.1. Μελέτες σε πειραματόζωα

Πολλές έρευνες καταδεικνύουν το ρόλο του συστήματος των μελανοκορτινών στη ρύθμιση του σωματικού βάρους. Οι αρχικές ενδείξεις για το ρόλο των μελανοκορτινών προήλθαν από μελέτες σε ποντίκια (MacNeil *et.al*, 2002). Μετά τη χαρτογράφηση των γονιδίων των υποδοχέων παρατηρήθηκε ότι ποντίκια τα οποία ήταν ομόζυγα για την έλλειψη του γονιδίου του υποδοχέα MC4R είχαν σημαντικά αυξημένο βάρος, ενώ αντίθετα τα ετερόζυγα δεν παρουσίασαν σημαντική αύξηση στο βάρος τους.

Τα συμπεράσματα αυτά ενισχύθηκαν από τα αποτελέσματα πειραμάτων όπου χρησιμοποιήθηκαν ανταγωνιστές του υποδοχέα. Οι ανταγωνιστές είναι ενώσεις που έχουν την ικανότητα να δεσμεύονται σε έναν υποδοχέα και να ανταγωνίζονται τα ενδογενή χημικά μηνύματα που παράγει ο οργανισμός, εμποδίζοντας έτσι την εκκίνηση της κυτταρικής απόκρισης, ενώ ως αγωνιστές ορίζονται τα χημικά μόρια που δεσμεύονται στον υποδοχέα και έχουν την ικανότητα να εκκινούν κυτταρική απόκριση.

Με τη χρήση ανταγωνιστών των υποδοχέων MC4R έγινε δυνατή η διαπίστωση ότι δέσμευση των υποδοχέων από μόρια ανταγωνιστές οδηγεί σε υπερφαγία και αύξηση του σωματικού βάρους. Το φαινόμενο αυτό είναι δυνατόν να αναστραφεί εφ' όσον απομακρυνθεί ο ανταγωνιστής. Επιπλέον, σε μελέτες όπου χορηγούνταν ενώσεις αγωνιστές, παρατηρήθηκε μείωση της πρόσληψης τροφής και ελάττωση του σωματικού βάρους.

Ενδογενείς ανταγωνιστές του υποδοχέα MC4R είναι τα πεπτίδια agouti-signaling protein (ASP) και agouti-related protein (AGRP). Η πρωτεΐνη ASP αποτελεί ανταγωνιστή του υποδοχέα MC4R αλλά και του υποδοχέα MC1R. Πρόκειται για ένα πεπτίδιο το οποίο εκφράζεται κύρια στην επιδερμίδα των θηλαστικών και δρα ρυθμίζοντας το χρώμα του δέρματος. Σε ποντίκια στα οποία προκαλείται υπερέκκριση

της πρωτεΐνης αυτής, τα επονομαζόμενα ποντίκια agouti, εμφανίζεται ένα σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από υπερφαγία, υπερινσουλιναιμία και παχυσαρκία. Το μόριο ASP έχει την ιδιότητα να δεσμεύεται στον MC4R εμποδίζοντας την πρόσδεση της α-MSH, γεγονός που οδηγεί σε υπερφαγία και ευθύνεται για το φαινότυπο παχυσαρκίας που παρατηρείται στα ποντίκια agouti.

Μετά την ανακάλυψη του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Agouti ανακαλύφθηκε ένα ομόλογο γονίδιο που κωδικοποιεί μια αντίστοιχη πρωτεΐνη η οποία ονομάστηκε Agouti-related protein (AgRP). Η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται στα επινεφρίδια και τον υποθάλαμο, έχει ανιχνευθεί σε μικρές ποσότητες στο πλάσμα τρωκτικών αλλά και του ανθρώπου και είναι ανταγωνιστής των υποδοχέων MC3R και MC4R. Η παροχή σε ενέσιμη μορφή της πρωτεΐνης AgRP σε τρωκτικά έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη πρόσληψη τροφής, ενώ ποντίκια στα οποία γίνεται υπερέκκριση της πρωτεΐνης είναι παχύσαρκα (Vergoni & Bertolini, 2000).

Την τελευταία δεκαετία με βάση μελέτες δομής-λειτουργίας, έγινε δυνατή η παραγωγή πολλών συνθετικών αναλόγων των μελανοκορτινών, τα οποία μελλοντικά θα βοηθήσουν στην περαιτέρω αύξηση των γνώσεων μας σχετικά με το μηχανισμό λειτουργίας τους.

Η επιβεβαίωση της σημασίας του υποδοχέα MC4R ήρθε και από τη δημιουργία knock out ποντικών στα οποία εξέλιπε το αντίστοιχο γονίδιο. Τα ομόζυγα knock out ποντίκια ήταν υπερβολικά παχύσαρκα και είχαν μειωμένη κατανάλωση οξυγόνου, γεγονός που φανερώνει ελαττωματικό ενεργειακό μεταβολισμό. Επίσης εκδήλωσαν υπερφαγία, υπερινσουλιναιμία και υπερλεπτιναιμία και είχαν μεγαλύτερο μήκος σώματος σε σχέση με τα φυσιολογικά ποντίκια. Σημειώνεται ότι τα ετερόζυγα knock out ποντίκια ήταν μετρίως παχύσαρκα, γεγονός από το οποίο μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι ο υποδοχέας MC4 δεν δρα σαν διακόπτης αλλά μάλλον σαν ρυθμιστής στο μηχανισμό πρόσληψης τροφής και το μεταβολισμό (Cone, 1999).

Σημειώνεται ότι συμπληρωματική δράση με αυτή του MC4R στην ενεργειακή ομοιόσταση φαίνεται να έχει ο υποδοχέας MC3. Knock out ποντίκια για το γονίδιο του

υποδοχέα MC3R δεν παρουσιάζουν υπερφαγία ή σημαντική αύξηση του σωματικού βάρους, έχουν όμως σημαντικά αυξημένο λιπώδη ιστό σε σχέση με τα φυσιολογικά.

1.7.2. Μελέτες σε ανθρώπους

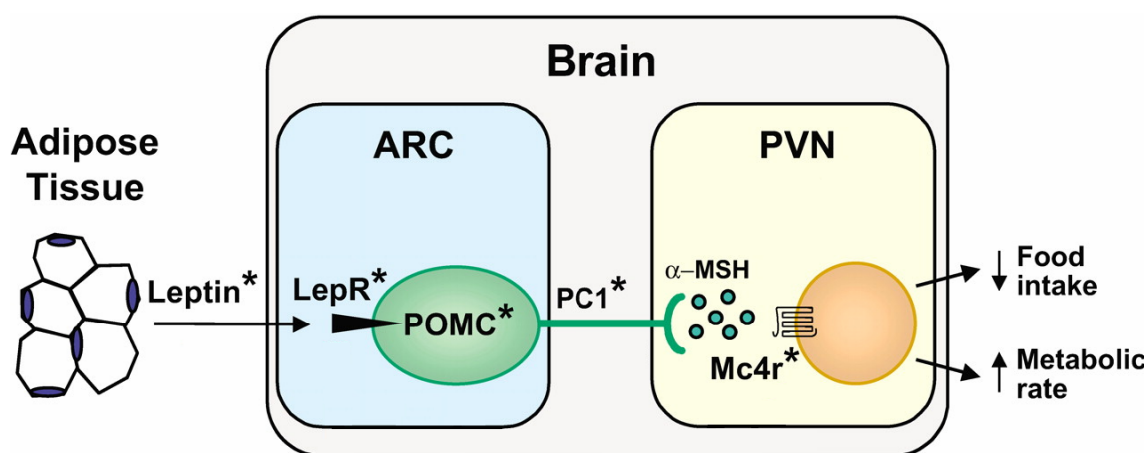
Οι πρώτες ενδείξεις ότι το σύστημα των μελανοκορτινών μπορεί να συνδέεται με την εμφάνιση παχυσαρκίας και στους ανθρώπους προήλθε από τη μελέτη ενός συνδρόμου ανάλογου με αυτό που παρατηρείται στα ποντίκια *agouti*. Οι ασθενείς εμφάνιζαν ένα σπάνιο σύνδρομο που περιλάμβανε ανεπάρκεια της αδρενοκορτικοτρόπου ορμόνης, κόκκινα μαλλιά και εμφάνιση παχυσαρκίας. Τα συμπτώματα αυτά συνυπήρχαν με ACTH στον ορρό του αίματος και έλλειψη α-MSH στο δέρμα και στον εγκέφαλο. Σε μέλη δύο οικογενειών που παρουσίαζαν το σύνδρομο αυτό αναγνωρίστηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο της προοιομελανοκορτίνης που οδηγούσαν σε μη ανιχνεύσιμα προϊόντα (null) (Cone, 2003). Στη συνέχεια αναγνωρίστηκαν ασθενείς οι οποίοι έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο προκονβερτάση-1, που οδηγούσαν σε μείωση της παραγωγής του (Yang & Harmon, 2003). Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις οι ασθενείς ήταν παχύσαρκοι και εμφάνιζαν υπερφαγία. Τα πρώτα αυτά στοιχεία υπέδειξαν ότι το σύστημα των μελανοκορτινών εξυπηρετεί την ενεργειακή ομοιόσταση στον άνθρωπο με τρόπο αντίστοιχο με αυτόν που συμβαίνει στα ποντίκια.

Στη συνέχεια δημοσιεύθηκαν οι πρώτες εργασίες σχετικές με ετερόζυγες μεταλλάξεις στο γονίδιο MC4R που συνδέονται με την εμφάνιση παχυσαρκίας, οι οποίες άνοιξαν ουσιαστικά το δρόμο για περαιτέρω έρευνες. Σήμερα οι μελέτες που εστιάζονται στη διερεύνηση της σχέσης ανθρώπινης παχυσαρκίας και μελανοκορτινών επικεντρώνουν το ενδιαφέρον τους στην αναγνώριση μεταλλάξεων στα υπεύθυνα γονίδια, τη διερεύνηση της φυσιολογικής σημασίας τους καθώς και την αλληλεπίδραση του συστήματος των μελανοκορτινών με άλλα μονοπάτια που ρυθμίζουν την ενεργειακή ομοιόσταση.

1.8. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΕΛΑΝΟΚΟΡΤΙΝΩΝ ΜΕ ΑΛΛΟΥΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΤΡΟΦΗΣ

Όπως φαίνεται, η παχυσαρκία είναι αποτέλεσμα ενός πολύπλοκου μηχανισμού με επίκεντρο το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, το οποίο αλληλεπιδρά μέσω διαφόρων χημικών παραγόντων με τα περιφερειακά συστήματα του οργανισμού. Τα αποτελέσματα μελετών, αρχικά σε πειραματικά μοντέλα ποντικών, αποκάλυψαν την ύπαρξη ενός περίπλοκου συστήματος με το οποίο ρυθμίζεται η πρόσληψη της τροφής, η ενεργειακή ομοιόσταση και η εναπόθεση του σωματικού λίπους. Στο μηχανισμό αυτό συμμετέχει και το σύστημα των μελανοκορτινών ελέγχοντας την παραγωγή άλλων βιοενεργών πεπτιδίων. Μέχρι σήμερα, έχει επιβεβαιωθεί η ύπαρξη αρκετών από τους παραπάνω μηχανισμούς και στον άνθρωπο. Κύρια σημεία στο δίκτυο αυτό είναι η πρωτεΐνη λεπτίνη και ο υποδοχέας της, το σύστημα των μελανοκορτινών και το νευροπεπτίδιο Y.

Η επίδραση της ορμόνης λεπτίνης στο σύστημα των μελανοκορτινών γίνεται μέσω της ενίσχυσης της έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρόδρομο ένωση προοπιομελανοκορτίνη. Κατ' επέκταση η λεπτίνη επάγει τη σύνθεση και έκκριση της α-MSH, η δέσμευση της οποίας στους υποδοχείς MC4R και MC3R στον εγκέφαλο περιορίζει την πρόσληψη τροφής και αυξάνει τον μεταβολισμό. Αντίθετα, μειωμένη παραγωγή ή η έλλειψη λεπτίνης έχει σαν αποτέλεσμα μείωση της POMC. Φαίνεται ότι η λεπτίνη δρα στον εγκέφαλο ερεθίζοντας ή/και επιτρέποντας την μεταφορά των σημάτων των μελανοκορτινών στα κέντρα του υποθαλάμου που σχετίζονται με τον έλεγχο της πρόσληψης τροφής. Η δράση μελανοκορτινών και λεπτίνης είναι συνεργιστική τουλάχιστον όσον αφορά στο Κ.Ν.Σ., όμως δεν αποκλείεται οι μελανοκορτίνες να εμπλέκονται στη δράση της λεπτίνης και σε περιφερειακό επίπεδο.



Εικόνα Error! Unknown switch argument.. Σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης MC4R και λεπτίνης.

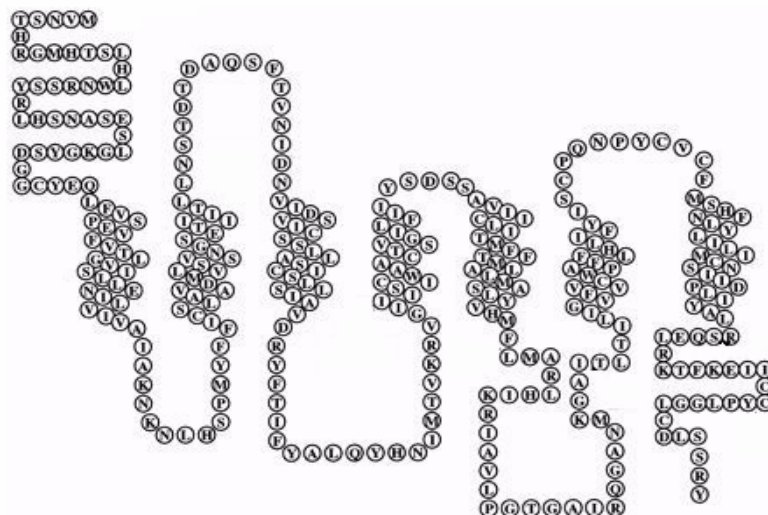
Το σύστημα των μελανοκορτινών επιδρά και στη δράση άλλων πεπτιδίων που επάγουν την πρόσληψη τροφής όπως το νευροπεπτίδιο Υ, η AGRP και η ορεξίνη. Ένδειξη αποτελεί το γεγονός ότι ενώ σε φυσιολογικά ποντίκια δεν παρατηρείται έκφραση του νευροπεπτιδίου Υ στους νευρώνες του υποθαλάμου, η έκφραση του νευροπεπτιδίου είναι πολύ έντονη τόσο σε ποντίκια agouti, όσο και σε ποντίκια knock out για τον υποδοχέα MC4R. Επιπλέον, η αυξημένη πρόσληψης τροφής που προκαλεί ή χορήγηση του HS014, ένωσης ανταγωνιστή του υποδοχέα MC4, μετριάζεται από την ταυτόχρονη χορήγηση της συνθετικής ένωσης 1229U91 που αναστέλλει τη δράση του υποδοχέα του νευροπεπτιδίου Υ. Τα παραπάνω δεδομένα σε συνδυασμό δείχνουν ότι οι μελανοκορτίνες παρεμποδίζουν την έκφραση του νευροπεπτιδίου Υ, μέσω μηχανισμού στον οποίο εμπλέκεται ο υποδοχέας MC4R (Vergoni, 2000).

1.9. ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ MC4R

1.9.1. Δομή

Ο ανθρώπινος υποδοχέας MC4R ήταν ο δεύτερος υποδοχέας μελανοκορτινών που χαρακτηρίστηκε. Είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με μήκος 332 αμινοξέα που αποτελείται από 7 διαμεμβρανικές λειτουργικές περιοχές με μορφή α-έλικας, 3 εξωκυτταρικές θηλίες και 3 ενδοκυτταρικές θηλίες. Το καρβοξυτελικό άκρο του υποδοχέα είναι συνδεδεμένο με το σύμπλεγμα της πρωτεΐνης G στο εσωτερικό του

κυττάρου, ενώ το αμινοτελικό άκρο προεξέχει προς την εξωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.



Εικόνα Error! Unknown switch argument.. Ο υποδοχέας MC4R

Περιοχή του υποδοχέα	Αριθμός αμινοξέων	Θέσεις
Αμινοτελικό άκρο	43	1-43
Διαμεμβρανική περιοχή 1	27	44 -70
Θηλιά 1 (ενδοκυτταρική)	11	71-82
Διαμεμβρανική περιοχή 2	24	82-105
Θηλιά 2 (εξωκυτταρική)	18	106-123
Διαμεμβρανική περιοχή 3	22	124-145
Θηλιά 3 (ενδοκυτταρική)	19	146-165
Διαμεμβρανική περιοχή 4	21	166-186
Θηλιά 4 (εξωκυτταρική)	12	187-199
Διαμεμβρανική περιοχή 5	19	200-218
Θηλιά 5 (ενδοκυτταρική)	27	219-246
Διαμεμβρανική περιοχή 6	25	247-271
Θηλιά 6 (εξωκυτταρική)	11	272-283
Διαμεμβρανική περιοχή 7	22	284-305
Καρβοξυτελικό άκρο	28	306-332

Πίνακας Error! Unknown switch argument.. Δομή του υποδοχέα MC4R

Οι υποδοχείς των μελανοκορτινών φέρουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά με άλλους υποδοχείς συνδεδεμένους με πρωτεΐνες G, για παράδειγμα θέσεις γλυκοζυλίωσης κοντά στο αμινοτελικό άκρο και θέσεις φωσφορυλίωσης στην πρώτη και τρίτη διαμεμβρανική περιοχή, καθώς και στο καρβοξυτελικό άκρο. Παρ' όλα αυτά

διαφέρουν σε ορισμένα χαρακτηριστικά που είναι κοινά στην υπεροικογένεια αυτή των υποδοχέων, όπως η παρουσία καταλοίπων κυστεΐνης στην πρώτη και δεύτερη εξωκυτταρική θηλιά, και προλίνης στην τέταρτη και πέμπτη διαμεμβρανική περιοχή. Όλοι οι υποδοχείς μελανοκορτινών περιέχουν την αλληλουχία DRY (ασπαρτικό οξύ - αργινίνη-τυροσίνη) στο σημείο έναρξης της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής και φέρουν κατάλοιπα κυστεΐνης στο καρβοξυτελικό άκρο τα οποία πιθανόν λειτουργούν σαν θέσεις ακυλίωσης.

Η θέση δέσμευσης του χημικού μηνύματος εντοπίζεται στα τμήματα του υποδοχέα που βρίσκονται προς στην εξωτερική πλευρά του κυττάρου. Αν και το αμινοτελικό άκρο και οι δύο πρώτες εξωκυττάρειες θηλιές θεωρούνται βασικά για τη δέσμευση του σήματος (Ho & MacKenzie, 1999), εντούτοις, το αμινοτελικό άκρο του ανθρώπινου υποδοχέα MC4R είναι περιορισμένου μήκους, γεγονός που υποδεικνύει ότι μάλλον δεν παίζει μεγάλο ρόλο στην ικανότητα δέσμευσης (Yang & Harmon, 2003). Δύο σημειακές μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στο αμινοτελικό άκρο σε υπερβολικά παχύσαρκους ασθενείς, δεν επηρέασαν σημαντικά την απόκριση ούτε την ικανότητα δέσμευσης του υποδοχέα για την α -MSH (Vaisse *et al*, 2000).

Ρόλο στη δέσμευση του μηνύματος πιθανόν να παίζουν ορισμένες θέσεις που είναι συντηρημένες και για τους πέντε τύπους υποδοχέων, καθώς και ορισμένες θέσεις που είναι αρνητικά φορτισμένες και εντοπίζονται στις διαμεμβρανικές περιοχές. Από τις έως σήμερα έρευνες έχειδειχθεί ότι τα κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος στις θέσεις 122 και 126 στην τρίτη διαμεμβρανική περιοχή και τα κατάλοιπα φαινυλαλανίνης (θέση 257) και ιστιδίνης (θέση 264) στην έκτη διαμεμβρανική περιοχή επηρεάζουν την ικανότητα δέσμευσης στον υποδοχέα.

Το καρβοξυτελικό άκρο αποτελείται από μια αλληλουχία 28 αμινοξέων. Η περιοχή των 15 πρώτων αμινοξέων του άκρου είναι συντηρημένη σε όλους τους υποδοχείς μελανοκορτινών παρ' ότι παρουσιάζει κάποιες διαφορές στα αμινοξέα που την αποτελούν. Όπως συμβαίνει και σε άλλες G συνδεδεμένες πρωτεΐνες, η αλληλουχία του καρβοξυτελικού άκρου περιλαμβάνει το ίδιο υδρόφοβο αμινοξύ σε δυο γειτονικές θέσεις. Στην περίπτωση αυτή πρόκειται για το αμινοξύ ισολευκίνη, που βρίσκεται στις θέσεις 316 και 317 της αμινοξικής αλληλουχίας και φαίνεται ότι παίζει ρόλο στην

φυσιολογική έκφραση του υποδοχέα στην κυτταρική επιφάνεια (van Leeuwen *et.al*, 2003). Ο μηχανισμός μέσω του οποίου συμβαίνει αυτό δεν είναι γνωστός, αλλά είναι πιθανόν να χρησιμεύει ως θέση για τη διέλευση του υποδοχέα από τη μεμβράνη ή την αναδίπλωση της πρωτεΐνης.

Επιπλέον, η καρβοξυτελική περιοχή καθορίζει την ικανότητα του υποδοχέα να ενεργοποιεί την κυτταρική απόκριση. Μεταλλάξεις που επιδρούν στην ικανότητα δέσμευσης του υποδοχέα στην πρωτεΐνη G και ενεργοποίησης του συστήματος της αδενυλικής κυκλάσης αναμένεται να έχουν ως αποτέλεσμα αυξημένη πρόσληψη τροφής και μειωμένες ενεργειακές δαπάνες.

Οι υποδοχείς συντίθενται στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου παραμένουν εφ' όσον δεν έχουν ακόμα πάρει την ώριμη (πλήρως γλυκοζυλιωμένη) μορφή. Υποδοχείς το πρωτεϊνικό μόριο των οποίων δεν έχει λάβει τη φυσιολογική διαμόρφωση αναδίπλωσης εγκλωβίζονται στο εσωτερικό του ενδοπλασματικού δικτύου, με αποτέλεσμα να επιτρέπεται η έξοδος μόνο των λειτουργικών υποδοχέων (Cobbold *et.al.*, 2003). Υπάρχουν σχετικά περιορισμένα δεδομένα για τη μεταφορά των υποδοχέων που είναι συνδεδεμένοι με G πρωτεΐνες στην επιφάνεια των κυττάρων (Ho & MacKenzie, 1999).

1.9.2. Λειτουργία

Όπως αναφέρθηκε, ο υποδοχέας MC4R δεσμεύει με διαφορετική συγγένεια τα διαφορετικά μέλη της ομάδας των μελανοκορτινών. Μεγαλύτερη συγγένεια παρουσιάζει για τις α-MSH και ACTH και ακολουθούν οι β-MSH και γ-MSH. Τα πεπτίδια αυτά φέρουν μια κοινή τετραπεπτιδική αλληλουχία που αποτελείται από ισταμίνη-φαινυλαλαμίνη-αργινίνη-τρυπτοφάνη η οποία σχετίζεται με την εξειδίκευση των υποδοχέων.

Όπως φαίνεται από πειράματα σε ποντίκια, ο μηχανισμός δράσης του υποδοχέα σχετίζεται με τη δημιουργία σήματος κορεσμού, και όχι με τον περιορισμό του αρχικού αισθήματος της πείνας. Σε πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε ο ανταγωνιστής HS014 αλλά και α-MSH μετά από περίοδο 18 ωρών χωρίς τροφή, ο χρόνος για τον οποίο διατρέφονταν στην πρώτη περίπτωση ήταν κατά 60%

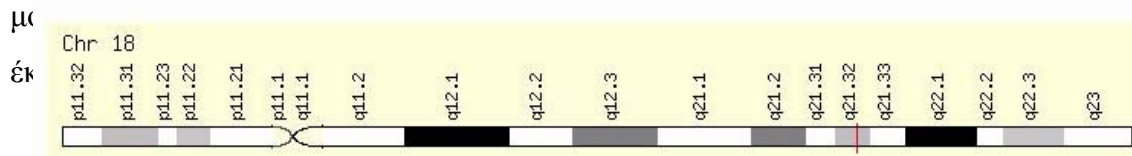
μεγαλύτερος απ' ότι στο μάρτυρα, ενώ στη δεύτερη μειώθηκε κατά περίπου 50% (Vergoni & Bertolini, 2000).

Νέες μελέτες δείχνουν ότι μετά τη χορήγηση του αγωνιστή MT-II η ενεργοποίηση του υποδοχέα μειώνει την πρόσληψη τροφής και ειδικότερα την πρόσληψη λίπους (Samama *et.al*, 2003). Έχει επίσης δειχθεί σε προηγούμενες μελέτες ότι ποντίκια με έλλειψη του MC4R παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα χρησιμοποίησης της ενέργειας που προέρχεται από το διαιτητικό λίπος. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου συμβαίνει αυτό δεν είναι γνωστός, θεωρείται όμως ότι η ενεργοποίηση του MC4R μπορεί να προωθεί την κινητοποίηση των αποθηκών λίπους στο σώμα, αποστέλλοντας συγχρόνως σήμα για μείωση της πρόσληψης λιπών. Εναλλακτικά, θεωρείται ότι το φαινόμενο αυτό είναι απόρροια περιορισμού του σήματος που προκαλεί την αίσθηση της ευχαρίστησης από την πρόσληψη της τροφής μέσω του MC4R στη δράσης της λεπτίνης. Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι ο υποδοχέας MC4R εκφράζεται σε μεγάλους αριθμούς καθ' όλη την εμβρυακή περίοδο, αλλά η σημασία του γεγονότος αυτού δεν είναι γνωστή.

Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι το σύστημα των μελανοκορτινών συνδέεται και με την εμφάνιση υποσιτισμού που οφείλεται σε νόσους, όπως για παράδειγμα στον καρκίνο. Σε MC4R knock out ποντίκια δειχθηκε ότι αυτά εκδήλωσαν καχεξία οφειλόμενη στον καρκίνο σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τα φυσιολογικά (Yang & Harmon, 2003). Επιπλέον η χορήγηση του ανταγωνιστή AGRP των MC4R και MC3R φαίνεται ότι προλαμβάνει την υποφαγία που οφείλεται σε ανάπτυξη καρκινικών όγκων.

1.10. ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ MC4R

Το ανθρώπινο γονίδιο του υποδοχέα της μελανοκορτίνης 4 αναγνωρίστηκε και κλωνοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1993 από την ομάδα του Gantz οι οποίοι έδειξαν ότι το γονίδιο αυτό εδράζεται στο χρωμόσωμα 18q21.3 και κωδικοποιείται από ένα



1.11. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ MC4R

Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί 46 διαφορετικές μεταλλάξεις του υποδοχέα που σχετίζονται με την παχυσαρκία, οι περισσότερες από τις οποίες οδηγούν σε λειτουργικές αλλαγές. Από τις μεταλλάξεις που έχουν αναγνωριστεί έως σήμερα, ελάχιστες αφορούν σε ομόζυγους φορείς.

Η πρώτη περίπτωση ομόζυγου φορέα μετάλλαξης (Asp-62-Ser) κατεγράφη από τον Farooqi και τους συνεργάτες του σε παιδιά με σοβαρής μορφής παχυσαρκία. Τα παιδιά αυτά είχαν συγγενική σχέση και ήταν Πακιστανικής καταγωγής, ενώ κανένας από τους ετεροζυγώτες γονείς τους δεν είχε ΔΜΣ ανώτερο του 30 kg/m² (Farooqi *et.al.*, 2000).

Επίσης ως ομόζυγος φορέα μετάλλαξης του γονιδίου MC4R αναγνωρίστηκε γυναίκα ιαπωνικής καταγωγής, η οποία ζύγιζε 160 κιλά (ΔΜΣ 62 kg/m²) και είχε εκδηλώσει πρώιμη έναρξη παχυσαρκίας. Πρόκειται για μία παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη στη θέση 98 (Glu98Arg) που εδράζεται στη δεύτερη διαμεμβρανική περιοχή. Οι γονείς της γυναίκας ήταν ετεροζυγώτες με τιμές ΔΜΣ 26 kg/m² και 27 kg/m² αντίστοιχα. Η γυναίκα αυτή έδειχνε αυξημένη επιθυμία για κατανάλωση υδατανθράκων κατά τις νυχτερινές ώρες, υψηλότερη οστική πυκνότητα σε σχέση με το μέσο όρο που αντιστοιχούσε σε γυναίκες της ηλικίας της, ενώ παρουσίαζε ελαφρά διανοητική καθυστέρηση στην ηλικία των 22 ετών. Εκτός από υπερινσουλιναμία και ελαφρώς υψηλότερα επίπεδα κορτιζόλης, τα επίπεδα των υπολοίπων ορμονών που εξετάστηκαν ήταν εντός των φυσιολογικών τιμών. Μετά από μελέτη της φυσιολογικής σημασίας της μετάλλαξης αυτής με έκφραση της σε κυτταρική σειρά, βρέθηκε ότι αυτή οδηγεί σε απώλεια της λειτουργικότητας του υποδοχέα. Με δεδομένο το γεγονός ότι το κατάλοιπο αργινίνης στη θέση 8 του α-MSH μπορεί να αντιδρά με όξινα κατάλοιπα στη δεύτερη και τρίτη διαμεμβρανική περιοχή του υποδοχέα, η αλλαγή του αμινοξέος γλυκίνη σε αργινίνη είναι εκείνη που πιθανόν ευθύνεται για την αδυναμία δέσμευσης του αγωνιστή (Kobayashi *et.al.*, 2002).

Ακόμη μία περίπτωση ομοζυγωτίας εντοπίστηκε από τους Tarnow *et.al.* και αφορούσε σε δύο άτομα με πρώιμη έναρξη παχυσαρκίας, που έφεραν την παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη Cys271Arg στην τρίτη εξωκυτταρική θηλιά του υποδοχέα, η οποία συνοδευόταν από μερική απώλεια της δράσης του υποδοχέα (Tarnow *et.al.*, 2003).

Όπως έχει αναφερθεί και από προηγούμενες μελέτες, οι ετεροζυγώτες που φέρουν μεταλλάξεις που οδηγούν σε μη ενεργό υποδοχέα δεν προκαλούν πάντα υπερβολική παχυσαρκία (Vaisse *et.al.*, 2000; Farooqi *et.al.*, 2000; Kobayashi *et.al.*, 2002). Η διαφορετική διεισδυτικότητα και ποικίλη έκφραστικότητα των μεταλλάξεων δείχνει ότι ο υποδοχέας δρα σε συνεργασία με άλλα γονίδια για τη ρύθμιση της ενεργειακής ομοιόστασης. Τα δεδομένα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τις παρατηρήσεις που έχουν γίνει σε ετερόζυγα ποντίκια, τα οποία παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία όσον αφορά τα φαινοτυπικά τους χαρακτηριστικά. Η μειωμένη διεισδυτικότητα και η ποικίλη έκφραστικότητα των μεταλλάξεων απαντάται σε άλλες περιπτώσεις νόσων που σχετίζονται με υποδοχείς συνδεδεμένους με G-πρωτεΐνες.

Οι επιστήμονες δεν έχουν καταλήξει μέσω ποίου ακριβώς μηχανισμού επιδρούν οι μεταλλάξεις αυτές, υπάρχουν όμως δύο πιθανολογούμενες εκδοχές. Θεωρείται ότι η μειωμένη δραστηριότητα του υποδοχέα οφείλεται στην ύπαρξη ενός αυτοσωμικού επικρατή μηχανισμού. Από την άλλη μεριά είναι πιθανόν η έλλειψη σε ένα αλληλόμορφο του γονιδίου MC4R (haploinsufficiency) να αποτελεί αιτία του φαινομένου (Dubern *et.al.*, 2001).

Μετάλλαξη	Περιοχή	Βιβλιογραφική αναφορά
Παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις		
Thr11Ser	AM	Vaisse <i>et.al.</i> , 2000
Arg18Cys	AM	Vaisse <i>et.al.</i> , 2000
Ser30Phe	AM	Hinney <i>et.al.</i> , 1999
Asp37Val	AM	Hinney <i>et.al.</i> , 1999
Val50Met	ΔΠ1	Dubern <i>et.al.</i> , 2001
Ser58Cys	ΔΠ1	Dubern <i>et.al.</i> , 2001
Asp62Ser (O)	ΔΠ1	Farooqi <i>et al.</i> , 2000

Pro78Leu	EΚΘ1	Hinney <i>et.al</i> , 1999
Gly98Arg (O)	ΔΠ 2	Kobayashi <i>et.al</i> , 2002
Ile102Ser	ΔΠ 2	Dubern <i>et.al</i> , 2001
Val103Ile (Π)	ΔΠ 2	Hinney <i>et.al</i> , 1999; Vaisse <i>et.al</i> , 2000; Dubern <i>et.al</i> , 2001;
Thr112Met	EΞΘ1	Hinney <i>et.al</i> , 1999
Thr 150 Ile	EΚΘ3	Vaisse, 2000
Arg165Trp	EΚΘ2	Hinney <i>et.al</i> , 1999; Vaisse <i>et.al</i> 2000
Ile170Val	ΔΠ 4	Vaisse, 2000 ; Dubern <i>et.al</i> , 2001
Leu250Gln	ΔΠ 6	Vaisse <i>et.al</i> , 2000
Ile251Leu (Π)	ΔΠ 6	Hinney <i>et.al</i> , 1999 ; Vaisse, 2000 ; Dubern <i>et.al</i> , 2001
Gly252Ser	ΔΠ 6	Hinney <i>et.al</i> , 1999
Cys271Arg (O)	ΔΠ 6	Tarnow <i>et.al</i> , 2003
Asn274Ser	EΞΘ6	Mergen <i>et.al</i> , 2001
Ile301Thr	ΔΠ 7	Vaisse <i>et.al</i> , 2000
Ile317Thr	KA	Hinney <i>et.al</i> , 1999
Ανερμηνεύσιμες μεταλλάξεις		
Tyr35X	AM	Hinney <i>et.al</i> , 1999 ; Sina <i>et.al.</i> , 1999
Μεταλλάξεις μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης		
47_48insG	AM	Vaisse <i>et.al</i> , 2000
279_280insGT	ΔΠ 2	Farooqi <i>et.al</i> , 2000
631_634delCTCT (stop codon)	ΔΠ 5	Yeo <i>et.al.</i> , 1998 ; Hinney at al., 1999
732_733insGATT (stop codon)	EΚΘ5	Vaisse <i>et.al.</i> , 1998
Σιωπηλές μεταλλάξεις		
579C>T	EΞΘ4	Hinney <i>et.al</i> , 1999
593C>T	EΞΘ4	Vaisse <i>et.al</i> , 2000

AM : Αμινοξτελικό άκρο, ΔΠ : Διαμεμβρανική Περιοχή, EΚΘ : Ενδοκυτταρική Θηλιά, EΞ : Εξωκυτταρική Θηλιά, KA : Καρβοξυτελικό Άκρο, (O) : Ομοζυγος φορέας, (Π) : Πολυμορφισμός.

Πίνακας Error! Unknown switch argument.. Μεταλλάξεις στον υποδοχέα MC4R που έχουν εντοπιστεί έως σήμερα σύμφωνα με το τρόπο ονοματολογίας μεταλλάξεων HUGO.

Τα είδη μεταλλάξεων του υποδοχέα MC4R που έχουν αναγνωριστεί μέχρι σήμερα μπορούν να καταταχθούν στις εξής κατηγορίες :

1.11.1. Παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις

Από το σύνολο των μεταλλάξεων που έχουν ανιχνευθεί στο γονίδιο MC4R, οι παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις αποτελούν το μεγαλύτερο αριθμό. Παρερμηνεύσιμες χαρακτηρίζονται οι μεταλλάξεις εκείνες στις οποίες η αντικατάσταση ενός

νουκλεοτιδίου με ένα άλλο έχει σαν αποτέλεσμα τη σύνθεση διαφορετικού αμινοξέος από εκείνο που συντίθεται φυσιολογικά.

Η σημειακή μεταλλαγή Leu250Gln που εντοπίστηκε και από τους Vaisse *et.al*, (Vaisse *et.al*, 2000) σε ένα υπερβολικά παχύσαρκο άτομο παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Από μελέτη που έγινε σχετικά με τη λειτουργικότητα των υποδοχέων αυτών φάνηκε ότι η αντικατάσταση αυτή αυξάνει την ικανότητα δέσμευσης του α-MSH, καθώς η συγγένεια για το μόριο αυτό δεκαπλασιάζεται. Η συσχέτιση της μετάλλαξης αυτής με την εμφάνιση παχυσαρκίας δημιουργεί ερωτηματικά, εφ' όσον η αυξημένη ικανότητα δέσμευσης θα οδηγούσε φυσιολογικά σε αυξημένη απόκριση δηλαδή στην ταχύτερη δημιουργία σήματος κορεσμού.

Ο Farooqi και οι συνεργάτες του αναγνώρισαν 5 νέες παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις σε Άγγλους ασθενείς. Δύο από τις παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις που εξετάστηκαν βρέθηκε να μην έχουν καμία ή να έχουν μερική μόνο ικανότητα δράσης (C271Y και N62S αντίστοιχα). Οι 5 ομόζυγοι φορείς της μετάλλαξης N62S ήταν άτομα παχύσαρκα, και συνδέονταν με συγγένεια εξ' αίματος, ενώ οι τέσσερις από τους ετερόζυγους φορείς δεν ήταν παχύσαρκοι. Η μελέτη αυτή αποτέλεσε την πρώτη καταγραφή περίπτωσης υπολειπόμενου πολυμορφισμού (Farooqi *et.al*, 2000).

Σε μελέτη που έγινε σε παιδιά και έφηβους γερμανικής καταγωγής συμμετείχαν συμμετείχαν 306 παχύσαρκα άτομα, 25 άτομα με βάρος χαμηλότερο από το φυσιολογικό, 52 άτομα με φυσιολογικό βάρος, 51 άτομα με επεισόδια ανορεξίας και 27 με επεισόδια βουλιμίας, και εντοπίστηκαν μεταξύ άλλων και 7 παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις. Σε όλες τις περιπτώσεις οι φορείς ήταν άτομα υπερβολικά παχύσαρκα. Δύο από τους φορείς της παρερμηνεύσιμης μετάλλαξης Asp-37-Val έφεραν συγχρόνως την ίδια ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη στο κωδικόνιο 35 (Tyr-35-Stop). Σε περαιτέρω έρευνα, η ίδια ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη στο κωδικόνιο 35 αναγνωρίστηκε και από τους Sina *et.al*. σε άλλο υπερβολικό παχύσαρκο άτομο, το οποίο απεδείχθη συγγενής του ενός από τους προηγούμενους φορείς (Sina *et.al.*, 1999). Επιπλέον αναγνωρίστηκαν οι μεταλλάξεις Ser-30-Phe, Gly-252-Ser στο ίδιο άτομο καθώς και οι Pr0-78-Leu, Thr-112-Met, Arg-165-Trp, Ile-317-Thr σε τέσσερις διαφορετικούς φορείς (Hinney *et al.*, 1999).

Το 2001 οι Dubern *et al.* αναγνώρισαν 4 παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις του υποδοχέα (Val-50-Met, Ser-58-Cys, Ile-102-Ser, Ile-170-Val) σε ετερόζυγους φορείς γαλλικής καταγωγής. Πέραν της παχυσαρκίας δεν παρατηρήθηκαν ιδιαίτερα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που να σχετίζονται με τις μεταλλάξεις αυτές. Η μετάλλαξη Ile-170-Val είχε καταγραφεί σε προηγούμενες μελέτες σε παχύσαρκους ενήλικες, και φαίνεται να σχετίζεται με μειωμένη δράση του υποδοχέα εξαιτίας της μειωμένης έκφρασης του στην επιφάνεια του κυττάρου και/ ή σε μειωμένη συγγένεια για τα χημικά μηνύματα.

1.11.2. Ανερμηνεύσιμες μεταλλάξεις

Οι ανερμηνεύσιμες μεταλλάξεις οφείλονται σε αντικατάσταση, έλλειψη ή προσθήκη ενός νουκλεοτιδίου, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την μετατροπή ενός φυσιολογικού κωδικονίου σε κωδικόνιο λήξης.

Όπως αναφέρθη πιο πάνω, έχει αναγνωριστεί μία ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη σε παχύσαρκα άτομα γερμανικής καταγωγής στο κωδικόνιο 35 (Tyr-35-Stop). (Sina *et.al.*, 1999; Hinney *et al.*, 1999). Φαίνεται ότι αποτέλεσμα της μετάλλαξης αυτής είναι ο σχηματισμός μιας μη ολοκληρωμένης πρωτεΐνης που έχει απωλέσει ένα τμήμα του αμινοτελικού εξωκυτταρικού άκρου.

1.11.3. Μεταλλάξεις που οφείλονται σε αλλαγές του πλαισίου ανάγνωσης εξαιτίας έλλειψης ή εισαγωγής βάσεων

Μία μετάλλαξη που οδηγεί σε μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης στο κωδικόνιο 211 εντοπίστηκε για πρώτη φορά από τους Yeo *et.al.* και οφείλεται στην έλλειψη 4 bp (631-634 delCTCT) που οδηγεί σε εισαγωγή 5 αμινοξέων στην αμινοξική αλληλουχία (Yeo *et.al.*, 1998) Αποτέλεσμα είναι η ύπαρξη κωδικονίου λήξης στην πέμπτη διαμεμβρανική περιοχή με τελική συνέπεια το σχηματισμό μη λειτουργικού υποδοχέα. Η ίδια μετάλλαξη αναγνωρίστηκε στην έρευνα του Hinney, σε μία γυναίκα και την μητέρα της, που ήταν ετερόζυγοι φορείς και υπερβολικά παχύσαρκες. Η μετάλλαξη αυτή κληρονομείται με επικρατή τρόπο.

Σε μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης οδηγεί και η εισαγωγή 4bp (732-733 insGATT) στο κωδικόνιο 244 με αποτέλεσμα το σχηματισμό πρωτεϊνικού υποδοχέα

στον οποίο λείπουν η έκτη και έβδομη διαμεμβρανική περιοχή (Vaisse *et.al.*, 1998). Οι ίδιοι κατέγραψαν επίσης άλλη μία περίπτωση μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης (47-48 insG) που οδηγεί σε μη λειτουργικό υποδοχέα (Vaisse *et.al.*, 2000). Στην περίπτωση αυτή ο υποδοχέας που σχηματίζεται φέρει τα πρώτα 16 αμινοξέα του MC4R αλλά σε αυτά προστίθενται επιπλέον 12 αμινοξέα.

1.11.4. Έλλειψη του γονιδίου MC4R

Σε έρευνα των Cody *et.al.* εξετάστηκαν άτομα με έλλειψη σε περιοχές του 18q, μεταξύ των οποίων και άτομα στα οποία έλλειπε η θέση του γονιδίου MC4R. Οι ερευνητές υπέθεσαν ότι η έλλειψη θα είχε σαν αποτέλεσμα εκδήλωση παχύσαρκου φαινότυπου, όμως δε βρέθηκαν διαφορές σε σχέση με άτομα με έλλειψη σε διαφορετικές περιοχές του ίδιου χρωμοσώματος (Cody *et.al.*, 1999).

1.11.5. Πολυμορφισμοί

Έχουν αναγνωριστεί από τους Hinney *et.al.* (Hinney *et.al.*, 1999) : α) ένας σιωπηλός πολυμορφισμός (C-579-T, Val-139-Val) στη δεύτερη εξωκυτταρική θηλιά σε άντρα με βάρος κατώτερο του φυσιολογικού, β) ο ήδη γνωστός πολυμορφισμός Val-103-Ile, (Gotoda *et al.* 1997), και γ) ένας νέος πολυμορφισμός (Ile-251-Leu).

1.12. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ MC4R

Οι λειτουργικές μεταβολές που προκαλούν οι μεταλλάξεις στο γονίδιο του υποδοχέα MC4R ποικίλουν και μπορεί να οφείλονται σε διαφορετικά αίτια. Τέτοια μπορεί να είναι :

- Η παρεμπόδιση της μεταφοράς του πρωτεϊνικού υποδοχέα από το εσωτερικό του κυττάρου στο εξωτερικό τμήμα της κυτταρικής μεμβράνης με αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση ή και αδυναμία έκφρασης των υποδοχέων στο εξωτερικό του κυττάρου.

- Αδυναμία δέσμευσης του χημικού μηνύματος από τον υποδοχέα.
- Αδυναμία κυτταρικής απόκρισης στα χημικά μηνύματα.

1.12.1. Παρεμπόδιση της μεταφοράς του πρωτεϊνικού υποδοχέα από το εσωτερικό του κυττάρου στο εξωτερικό τμήμα της κυτταρικής μεμβράνης.

Οι πρωτεϊνικοί υποδοχείς συντίθενται στο εσωτερικό του κυττάρου και στη συνέχεια μεταφέρονται και καταλαμβάνουν τις θέσεις τους στο εξωκυττάριο τμήμα της μεμβράνης.

Οι Ho και MacKenzie (Ho & MacKenzie, 1999) μελέτησαν τη λειτουργική σημασία δύο μεταλλάξεων που οφείλονται σε έλλειψη και εισαγωγή βάσεων στα κωδικόνια 211 και 244 αντίστοιχα. Η μελέτη έγινε με εισαγωγή και έκφραση των μεταλλάξεων αυτών (transfection) στις κυτταρικές σειρές 293T και COS-7. Το αποτέλεσμα ήταν η αδυναμία δέσμευσης μορίων αγωνιστών καθώς και απόκρισης στα μηνυματοφόρα σήματα, παρότι οι μεταλλάξεις αυτές δεν δικαιολογούσαν δομικές αλλαγές στον υποδοχέα. Με μελέτες ανοσοφθορισμού αποκαλύφθηκε η έκφραση και παρουσία των υποδοχέων στον ενδοκυττάριο χώρο, αλλά απουσία τους στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις δεν επηρέασαν το σχηματισμό του υποδοχέα, αλλά είχαν σαν αποτέλεσμα την αδυναμία μεταφοράς του στην επιφάνεια των κυττάρων. Οι ερευνητές κατέληξαν ότι η αλληλουχία SQELRKTFKIIIC στο καρβοξυτελικό άκρο του υποδοχέα είναι απαραίτητη για την διευθέτηση του στην επιφάνεια της κυττοπλασματικής μεμβράνης. Είναι γνωστό ότι ένα τμήμα του καρβοξυτελικού άκρου είναι κοινό για όλους τους MCR's και πιθανόν ευθύνεται για την ικανότητα μεταφοράς τους στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Το τμήμα αυτό της πεπτιδικής αλυσίδας αποτελείται από 27 αμινοξέα, εκ των οποίων τα 14 είναι κοινά και για τους 5 υποδοχείς μελανοκορτινών. Οι ίδιοι ερευνητές μελέτησαν την αλληλουχία και την έκφραση της πρωτεΐνης στην οποία έλλειπε το εντός του κυττάρου καρβοξυτελικό άκρο, οπότε και παρατήρησαν ότι δεν γινόταν η μεταφορά της στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και συνεπώς δεν υπήρχε απόκριση στα χημικά σήματα. Τέλος, εκτιμήθηκε η ικανότητα

των μεταλλάξεων αυτών να παρεμποδίζουν τη λειτουργία των αρχικών φυσιολογικών (wild type) υποδοχέων κάτι που όμως δε φάνηκε να ισχύει.

Οι Lubrano-Bertheliet *et.al.* (Lubrano-Bertheliet *et.al.*, 2003) μελέτησαν τη φυσιολογική σημασία 14 συνολικά παρερμηνεύσιμων μεταλλάξεων, επικεντρώνοντας το ενδιαφέρον τους στην ικανότητα έκφρασης των υποδοχέων στο εξωτερικό της μεμβράνης. Με μία ποσοτική μέθοδο που ανέπτυξαν χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής, και συγκρίνοντας με φυσιολογικούς υποδοχείς, συμπέραναν ότι στο 81.3% των περιπτώσεων προκαλείται μερική ή ολική συγκράτηση του υποδοχέα ενδοκυτταρικά και παρεμπόδιση της μεταφοράς του στην κυτταρική επιφάνεια. Στη μια από τις περιπτώσεις (Ser-30-Phe/Gly-25-Ser), ο συνδυασμός είχε σαν αποτέλεσμα διαφοροποίηση της μεμβρανικής έκφρασης του υποδοχέα, ενώ οι δύο μεταλλάξεις ξεχωριστά δεν είχαν ανάλογο αποτέλεσμα. Ανάλογος μηχανισμός μη φυσιολογικής μεταφοράς των πρωτεϊνικών μορίων εξωκυτταρικά έχει βρεθεί και σε άλλες κληρονομούμενες νόσους που οφείλονται σε μεταλλάξεις, όπως η μεταφορά του υποδοχέα της LDL σε ορισμένες μορφές οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας.

1.12.2. Ο υποδοχέας αδυνατεί να δεσμεύσει τα χημικά μηνύματα.

Στην περίπτωση αυτή ο υποδοχέας συντίθεται και μεταφέρεται κανονικά στην επιφάνεια του κυττάρου, αλλά αδυνατεί να δεσμεύσει τα χημικά μηνύματα. Η αδυναμία αυτή οφείλεται σε αλλαγές στη διαμόρφωση των διαμεμβρανικών περιοχών του υποδοχέα, καθώς η δέσμευση του χημικού μηνύματος γίνεται από τα τμήματα των διαμεμβρανικών περιοχών που βρίσκονται προς την εξωτερική πλευρά του κυττάρου.

Οι Ho και MacKenzie (Ho & MacKenzie, 1999) κατέληξαν ότι τροποποιημένοι υποδοχείς που περιείχαν 5 διαμεμβρανικές περιοχές δεν μπορούσαν να δεσμεύσουν τα μηνυματοφόρα μόρια. Οι Nijenhuis και οι συνεργάτες του μελέτησαν 11 παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις όσον αφορά τη συγγένεια τους για τον αγωνιστή α-MSH και τον ανταγωνιστή AGRP. Κατέληξαν ότι η συγγένεια δέσμευσης για τους υποδοχείς αυτούς δε διέφερε σε σχέση με αυτή του φυσιολογικού υποδοχέα, εκτός από 3 μεταλλάξεις (I-301-T, L-250-Q και T-112-M) που εμφάνισαν αυξημένη συγγένεια για το α-MSH αλλά και την πρωτεΐνη AGRP-(83-132). Επίσης παρατηρήθηκε ότι η αναλογία που εκφράζει τη συγγένεια δέσμευσης α-MSH/AGRP παρέμεινε περίπου

σταθερή σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις, φαινόμενο που δείχνει ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο (Nijenhuis *et.al*, 2003).

Σε *in vitro* δοκιμές μελετήθηκε η έκφραση της μετάλλαξης (Ile-137-Thr) και βρέθηκε ότι αυτή εμποδίζει την δέσμευση στον υποδοχέα και τη δημιουργία σήματος απόκρισης (Gu, 1999, Hinney *et.al.*, 1999). Η επίδραση αυτή όμως φαίνεται να είναι αντιστρεπτή.

Σημαντικό ρόλο στην ικανότητα δέσμευσης από τον υποδοχέα φαίνεται να παίζουν τα κατάλοιπα κυστεΐνης στην αμινοξική αλληλουχία στις περιοχές του υποδοχέα που σχετίζονται με τη δεσμευτική ικανότητα. Έχειδειχθεί ότι αντικατάσταση της κυστεΐνης από άλλη βάση στην τρίτη εξωκυτταρική θηλιά έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια της ικανότητας δέσμευσης (Tarnow *et.al*, 2003). Στο σημείο αυτό το κατάλοιπο κυστεΐνης στη θέση 271 σχηματίζει δισουλφιδικό δεσμό με το κατάλοιπο κυστεΐνης στη θέση 279. Επιπλέον η διατάραξη του δεσμού αυτού οδηγεί στη δημιουργία ενός άλλου δισουλφιδικού δεσμού, αυτή τη φορά μεταξύ των καταλοίπων στις θέσεις 271 και 279. Η θέση 271 φαίνεται ότι επιδρά στη λειτουργικότητα του υποδοχέα, και αντικατάσταση της κυστεΐνης στη θέση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα απώλεια της λειτουργίας του.

1.12.3. Μεταλλάξεις στις οποίες δεσμεύεται το χημικό μήνυμα αλλά δεν δημιουργείται κυτταρική απόκριση.

Στην περίπτωση αυτή το χημικό μήνυμα δεσμεύεται αλλά δεν δημιουργείται κυτταρική απόκριση. Όπως αναφέρθηκε, η δέσμευση του μηνύματος πυροδοτεί την αλλαγή της στερεοδιάταξης του πρωτεϊνικού υποδοχέα, την οποία ακολουθεί η απόκριση στο μήνυμα. Επομένως, μεταλλάξεις σε θέσεις που επηρεάζουν τη στερεοδιάταξη του υποδοχέα, έχουν σημασία για τη ικανότητα ενεργοποίησής του. Έχειδειχθεί ότι η έλλειψη τμήματος της αμινοξικής αλληλουχίας του καρβοξυτελικού άκρου του υποδοχέα μπορεί να ευθύνεται για την έλλειψη απόκρισης.

Από νεότερες έρευνες φαίνεται ότι η τρίτη θηλιά του υποδοχέα που βρίσκεται στο εσωτερικό του κυττάρου παίζει σημαντικό ρόλο στην απόκριση, καθώς καθορίζει την

ικανότητα σύνδεσης του υποδοχέα με τη G- πρωτεΐνη. Μετά την ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας στο σημείο αυτό και δημιουργήθηκαν υποδοχείς στους οποίους αντικαταστάθηκαν ορισμένα από τα αμινοξικά κατάλοιπα. Παρατηρήθηκε ότι αντικατάσταση των καταλοίπων στις θέσεις 220 και 232 (Arg220 και Thr232) καταλοίπων από αλανίνη και βαλίνη ή αλανίνη αντίστοιχα, έχει σαν αποτέλεσμα αυξημένη ικανότητα σύνδεσης του υποδοχέα με τη G- πρωτεΐνη (Kim *et.al*, 2002).

1.12.4. Μεταλλάξεις στον υποκινητή της μεταγραφής του υποδοχέα

Οι ερευνητές Lubrano-Berthelie (Lubrano-Berthelie *et.al.*, 2003) διερεύνησαν την ύπαρξη μεταλλάξεων σε σημεία των υποκινητών της μεταγραφής του υποδοχέα, που μπορεί να είχαν σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση παχυσαρκίας. Εντοπίστηκαν δυο κύριες περιοχές όπου γίνεται η έναρξη μεταγραφής, στα 426 bp και 139 bp αναρροϊκά (upstream) του κωδικονίου μετάφρασης και πολλαπλά σημεία μικρότερης σημασίας που κυμαίνονται από 213 έως 366 bp, καθώς και μια περιοχή 80 bp η οποία φαίνεται να είναι απαραίτητη για τη λειτουργία του υποκινητή. Σε έρευνα που έγινε σε 431 παχύσαρκα παιδιά και ενήλικες παρατηρήθηκε ότι η επίδραση τέτοιων μεταλλάξεων στην εμφάνιση παχυσαρκίας δεν ήταν σημαντική.

1.13. ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

Από μελέτες σε πειραματόζωα, μεταλλάξεις στον υποδοχέα MC4R έχουν συσχετιστεί εκτός από την παχυσαρκία, με την εμφάνιση υπερφαγίας, υπερινσουλιναϊμίας και υπεργλυκαιμίας. Ανάλογες εκδηλώσεις έχουν παρατηρηθεί και σε ανθρώπους που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο του υποδοχέα MC4R.

Φαινότυποι οι οποίοι σχετίζονται με επικρατούσες μεταλλάξεις του MC4R είναι η πρώιμα εμφανιζόμενη οξεία υπερφαγία, η απόκτηση ύψους μεγαλύτερου από το αναμενόμενο βάση του ύψους των γονιών και η αυξημένη οστική πυκνότητα. Μετά από έρευνα σε παιδιά ο Farooqi (Farooqi *et.al*, 2000) κατέγραψε συγκεκριμένες συμπεριφορές όπως αίσθημα υπερβολικής πείνας και αναζήτησης τροφής. Αναφέρεται επίσης υπερινσουλιναϊμία, παρά τα φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης, αυξημένο ύψος και ταχύτητα απόκτησης ύψους, καθώς και αυξημένη οστική πυκνότητα.

Δύο γυναίκες ασθενείς που έφεραν την παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη N-274-S ανέφεραν υπερφαγία και πρόωμη έναρξη παχυσαρκίας στην παιδική ηλικία. Από τα κλινικά χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν (ολική χοληστερόλη, HDL, LDL και VLDL χοληστερόλη, ασβέστιο πλάσματος, ουρία, κρεατινίνη, επίπεδα θυρεοειδικών ορμονών) μόνο το ένα άτομο διέφερε από τα φυσιολογικές τιμές όσον αφορά στα επίπεδα γλυκόζης, έπασχε δηλαδή από σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Και οι δύο ασθενείς έπασχαν από υπέρταση (Mergen *et.al.*, 2001) ενώ εκδήλωναν και ψυχικές διαταραχές (κυκλοθυμία και διπολική συμπεριφορά).

Σε άλλη μελέτη παρατηρήθηκε ότι παχύσαρκα άτομα που έφεραν μεταλλάξεις στον υποδοχέα δεν έπασχαν από διαβήτη ή υπέρταση, και τα επίπεδα λεπτίνης ήταν φυσιολογικά. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση αυτή εμφάνιζαν εναπόθεση λίπους που είχε σαν αποτέλεσμα γυναικοειδούς τύπου παχυσαρκία.

Σε μελέτη όπου εξετάστηκε η επίδραση του πολυμορφισμού Val-103-Ile σε ορισμένα κλινικά χαρακτηριστικά, οι ετεροζυγώτες είχαν χαμηλότερες τιμές όσον αφορά το πηλίκο περιφέρειας μέσης/περιφέρεια γλουτών (waist-to-hip ratio), έτειναν να έχουν μικρότερο δείκτη μάζας σώματος και περιφέρεια μέσης. Επίσης, είχαν οριακά χαμηλότερα επίπεδα λεπτίνης και χοληστερόλης. Ακόμα, τα επίπεδα κορτιζόλης ήταν υψηλότερα, όταν αυτά μετρήθηκαν σε συγκεκριμένη στιγμή κατά τις πρωινές ώρες, αλλά και μετά από προκαθορισμένο χρονικό διάστημα (30 και 60 λεπτά) μετά το γεύμα (Rosmond *et.al.*, 2001).

Οι Dubern *et.al* δεν βρήκαν διαφορές στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά (ΔΜΣ, ύψος, ηλικία έναρξης εμφάνισης παχυσαρκίας) ή σε κλινικές παραμέτρους (αρτηριακή πίεση, γλυκόζη και λιπίδια αίματος) παιδιών τα οποία έφεραν συγκεκριμένες μεταλλάξεις (Val50Met, Ser58Cys, Ile102Ser, Ile170Val, Val103Ile, Ile251Leu). Σε δύο από τα άτομα που συμμετείχαν στη μελέτη και έφεραν τη μετάλλαξη Ser-58-Cys παρατηρήθηκε υψηλότερη περιεκτικότητα αλάτων στο σκελετό (Dubern *et.al*, 2001)

1.14. ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ MC4R ΚΑΙ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΛΗΨΗΣ ΤΡΟΦΗΣ

Σε έρευνα με πειραματόζωα, ποντίκια υποβλήθηκαν σε συνθήκες στρες, με αποτέλεσμα τη μείωση της προσλαμβανόμενης τροφής. Σε ορισμένα από αυτά χορηγήθηκε σε ενέσιμη μορφή η ένωση HS014, ενός συνθετικού ανταγωνιστή του υποδοχέα MC4R. Τα ποντίκια αυτά εμφάνισαν αυξημένη πρόσληψη τροφής σε σχέση με όσο δεν έλαβαν την αγωγή, αλλά μικρότερη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου που δεν υπεβλήθη σε στρες (Vergoni & Bertolini, 2000). Φαίνεται ότι δέσμευση του υποδοχέα από τον ανταγωνιστή μπορεί να παρεμποδίσει μερικώς την εκδήλωση ανορεξίας που προκαλείται από στρεσογόνες καταστάσεις.

Σήμερα εξετάζεται η σύνδεση μεταλλάξεων στον υποδοχέα MC4R με την εκδήλωση διαταραχών λήψης τροφής και στους ανθρώπους. Σε αρκετές από τις μελέτες όπου έχουν καταγραφεί φορείς διαφόρων μεταλλάξεων του MC4R, συμπεριλαμβάνονται περιπτώσεις ατόμων που εμφάνιζαν διαταραχές όπως βουλιμία και ανορεξία.

1.15. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΤΗΣ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ MC4R

Καθώς το φαινόμενο της παχυσαρκίας έχει λάβει διαστάσεις επιδημίας σε όλο τον κόσμο, αναζητώνται νέοι τρόποι αντιμετώπισης του. Η φαρμακολογική αντιμετώπιση της παχυσαρκίας θα μπορούσε ίσως να δώσει αποτέλεσμα στις περιπτώσεις όπου οι παραδοσιακές μέθοδοι όπως η δίαιτα και η άσκηση δεν επαρκούν.

Τα φάρμακα που κυκλοφορούν σήμερα με αυτό το σκοπό αποσκοπούν στη μείωση της όρεξης (sibutramine, Reductal) και στην παρεμπόδιση της απορρόφησης του διαιτητικού λίπους από τις τροφές (orlistat, Xenical). Η ανακάλυψη νέων μηχανισμών και γονιδίων στόχων που σχετίζονται με την παχυσαρκία ανοίγει νέους δρόμους για τη δημιουργία νέων φαρμάκων που θα μπορούν να αντιμετωπίσουν την παχυσαρκία.

Σε φαρμακολογικές μελέτες σε πειραματόζωα φαίνεται ότι η χορήγηση πεπτιδίων αγωνιστών του υποδοχέα MC4R μειώνει την όρεξη, ενώ η χορήγηση ενώσεων ανταγωνιστών έχει τα αντίθετα αποτελέσματα (Chiesi *et.al.*, 2001). Μέχρι σήμερα έχουν σχεδιαστεί διάφοροι συνθετικοί ανταγωνιστές του υποδοχέα MC4R που

παρουσιάζουν διαφορετική χημική συγγένεια και η δράση ορισμένων από αυτούς έχουν δοκιμαστεί σε πειραματόζωα.

Ο σημαντικός ρόλος του υποδοχέα MC4 στην εκδήλωση παχυσαρκίας είναι πιθανόν να προσφέρει στο μέλλον νέες δυνατότητες φαρμακολογικής αντιμετώπισης της νόσου με τη βοήθεια ενώσεων αγωνιστών του υποδοχέα. Μια τέτοια φαρμακολογική αντιμετώπιση προϋποθέτει τη δημιουργία ενός φαρμάκου εξαιρετικά εξειδικευμένου με μηδαμινές ή όσο το δυνατόν λιγότερες συνέπειες στη δράση των υπόλοιπων υποδοχέων των μελανοκορτινών. Συγχρόνως, είναι σημαντικό να αξιολογηθεί και να εκτιμηθεί η πιθανότητα η χρόνια λήψη μιας τέτοιας φαρμακευτικής ουσίας να οδηγήσει σε μειωμένη ευαισθησία ή ανενεργοποίηση της απόκρισης του υποδοχέα.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο του υποδοχέα της μελανοκορτίνης 4 (MC4R) σε δείγμα ελλήνων παχύσαρκων παιδιών, με τη χρήση της τεχνικής DGGE (ηλεκτροφόρηση κλίσης με αποδιατακτικούς παράγοντες). Σύμφωνα με βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί αρκετές περιπτώσεις μεταλλάξεων σε ευρωπαϊκές χώρες αλλά και χώρες της Μεσογείου και εκτιμάται ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο του υποδοχέα MC4R είναι υπεύθυνες για ποσοστό εμφάνισης παχυσαρκίας από 0.5-6%. Στην Ελλάδα δεν έχει πραγματοποιηθεί παρόμοια έρευνα έως σήμερα ούτε και χρήση της τεχνικής DGGE για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο αυτό.

2.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. Πλαστικά - γυαλικά

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής πλαστικά : σωληνάκια εργαστηρίου των 15 και 50ml (Falcon), πλαστικές πιπέτες Pasteur, ακροφύσια των 2μl, 100μl και 1000μl, σωληνάκια erppendorf των 1.5 και 0.5 ml, κυψελίδες φωτομέτρησης.

Τα γυαλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν : ποτήρια ζέσεως των 100ml, φιάλες Duram των 200 και 1000 ml, κωνικές φιάλες των 250 ml, πιπέτες Pasteur.

2.2.2. Όργανα

- pH- μέτρο (WTW 537)
- Φυγόκεντρος (Herinle Z320)
- Υδατόλουτρο (Memmert)
- Ζυγός ακριβείας (Gibertini)
- Αυτόματες πιπέτες 2, 20, 100, 200, 1000 μl (HTL, Gilson)
- Vortex (IKA Minishaker MSI)
- Φωτόμετρο (Eppendorf Biofotometer)
- Μηχάνημα PCR (Primus 96 Plus MW GAG Biotech, Peltier Thermal Cycler MJ Research PTC-200)

- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Owl Separation System B1A, Easy Cast Electrophoresis System Model B2, Owl)
- Τροφοδοτικό ηλεκτροφόρησης (Owl scientific OSP-250L Power Supply)
- Συσκευή σχηματισμού πηκτώματος κλίσης συγκέντρωσης (DCode, Bio-Rad)
- Θάλαμος UV (UVP)

Για την αποθήκευση και επεξεργασία των φωτογραφιών σε ηλεκτρονική μορφή χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα GRAB-IT.

2.2.3. Διαλύματα

Tris Borate Acid (TBE 5x)

Tris Base	54 gr
Boric Acid	27.5 gr
EDTA 0.5 M	20 ml
Απιονισμένο νερό	1 Lt

TAE 50 x

Tris Base	242 gr
Glacial acetic acid	57,1 ml
EDTA 0.5 M	100 ml
Απιονισμένο νερό	1 Lt

Για τα πηκτώματα ηλεκτροφόρησης :

Αγαρόζη (IHT Biotechnology)

Βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)

Για την παρασκευή πηκτώματος ακρυλαμίδης με κλίση αποδιατακτικών παραγόντων:

- Διάλυμα ακρυλαμίδης 0%
75 ml ακρυλαμίδη 40% (37.5:1)
10 ml TAE 50 x
415 ml απιονισμένο νερό

- Αποδιατακτικό διάλυμα 80%
75 ml ακρυλαμίδη 40% (37.5:1)
170 gr ουρία
160 ml φορμαμίδη
10 ml TAE 50 x
255 ml απιονισμένο νερό
Διήθηση υπό κενό
- Αποδιατακτικό διάλυμα ακρυλαμίδης 20 %
12 ml διάλυμα ακρυλαμίδης 0%
4 ml αποδιατακτικό διάλυμα ακρυλαμίδης 80%
130 μ l APS
14 μ l TEMED
- Αποδιατακτικό διάλυμα ακρυλαμίδης 50 %
10 ml διάλυμα ακρυλαμίδης 0%
6 ml αποδιατακτικό διάλυμα ακρυλαμίδης 80%
130 μ l APS
14 μ l TEMED
- Υπερθειικό αμμώνιο (APS - stock solution) 100 mg/ml
- TEMED

2.2.4. Δείγμα

Συλλέχθηκαν δείγματα αίματος από 21 παχύσαρκα παιδιά, μαθητές του ιδιωτικού εκπαιδευτηρίου "ΓΕΙΤΟΝΑΣ". Η απομόνωση DNA έγινε από δείγμα αίματος περίπου 2 ml, εκτός από τα δείγματα A1, E2 και F1 που είχαν όγκο 1 ml.

2.2.5. Απομόνωση DNA

Η απομόνωση DNA έγινε με kit (Gentra Systems). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής :

- 1) Σε πλαστικό σωλήνα Falcon τοποθετούνται 6 ml RBC Lysis Buffer και προστίθενται 2 ml από το δείγμα αίματος.
- 2) Διατηρούμε τους σωλήνες σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min αναδεύοντας ανά τακτά χρονικά διαστήματα, περίπου ανά 2 min.
- 3) Φυγοκέντρωση στα 3000rpm για 10 min.
- 4) Απομακρύνεται το υπερκείμενο και με τη χρήση vortex αναδεύουμε για την επαναδιάλυση του ιζήματος.
- 5) Προστίθενται 2 ml Cell Lysis Buffer και αναμιγνύεται με πλαστική πιπέτα Pasteur. Τα δείγματα παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου όλο το βράδυ.
- 6) Προστίθενται 667μl Protein Precipitate Solution.
- 7) Vortex για 20 sec.
- 8) Φυγοκέντρωση στα 3000 rpm για 10 min.
- 9) Σε διαφορετικό πλαστικό σωλήνα Falcon τοποθετούνται 2 ml ισοπροπανόλης και προστίθεται το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης.
- 10) Αναδεύεται ο σωλήνας και στη συνέχεια φυγοκεντρούμε στα 3000 rpm για 3 min.
- 11) Απομακρύνεται το υπερκείμενο (ισοπροπανόλη) και στο εναπομείναν διάλυμα DNA προστίθενται 2 ml αιθανόλης.
- 12) Ανάδευση και φυγοκέντρωση στα 3000 rpm για 1 min.
- 13) Απομακρύνεται το υπερκείμενο (αιθανόλη) και το ίζημα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου απομακρυνθεί τελείως η αιθανόλη.
- 14) Προστίθενται 200 μl Hydration Buffer για την επαναδιάλυση του DNA.

2.2.6. Φωτομέτρηση DNA

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του DNA που απομονώθηκε γίνεται με φωτομέτρηση στα 260-280 nm. Η απορρόφηση στα 260 nm αντιστοιχεί στο DNA που περιέχεται στο διάλυμα, ενώ η απορρόφηση στα 280nm στις πρωτεΐνες. Υπολογίζοντας το λόγο OD260/OD280 εκτιμάται η καθαρότητα του DNA. Πριν από τη φωτομέτρηση τα δείγματα προετοιμάζονται ως εξής :

- 1) Τα δείγματα DNA τοποθετούνται για 10 min σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 50 °C.
- 2) Γίνεται ανάδευση σε vortex και στη συνέχεια το DNA αραιώνεται 1:100 με απιονισμένο νερό (5μl DNA : 495 μl νερό).

2.2.7. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

2.2.7.1. Εκκινητές

Για τη διενέργεια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σχεδιάστηκαν εκκινητές για 4 τμήματα του γονιδίου MC4R. Οι εκκινητές ήταν οι εξής :

Τμήμα	Εκκινητής	Ολιγονουκλεοτίδιο
1	MC4R F1	5' - GAC ACT GGA ATT CTC CTG CC - 3'
	MC4R R1	5' - GCC CGC CCC CGC CGC CCT GCC CGC GCC CCG CGC CGC CCG CAC TGT TTA ATA GGG TGA T - 3'
2	MC4R F2	5' - CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC GTC AAA TGG ATC AGA AAC C - 3'
	MC4R R2	5' - GAG GCA GAT GAT GAC AGC ACT ACT - 3'
3	MC4R F3	5' - CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC GTT GTT CAT CAT TTA CTC AGA - 3'
	MC4R R3	5' - CGG GCG GCG GGG TGG ATT CTG AGG ACA AGA G - 3'
4	MC4R F4	5' - CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC GCT CCA CTT AAT ATT CTA CAT - 3'
	MC4R R4	5' - GCA TGT TCC TAT ATT GCG TGC TCT - 3'

Οι εκκινητές παρελήφθησαν σε ξηρή μορφή και διαλυτοποιήθηκαν με προσθήκη νερού σε συγκέντρωση 0,05 μmol (stock solution). Από τα διαλύματα αυτά παρασκευάστηκαν νέα διαλύματα (working solutions) με αραίωση 1:8 του αρχικού, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο PCR.

Η αλληλουχία των βάσεων για το κάθε τμήμα του γονιδίου που εξετάστηκε φαίνεται στον πίνακα:

ΤΜΗΜΑ	ΜΕΓΕΘΟΣ
Τμήμα 1 361 aattcagggg <i>gacactggaa ttctcctgcc agcatggtga actccacca cctgtgggatg</i> 421 <i>cacactctc tgcacctctg gaaccgcagc agttacagac tgcacagcaa tgccagtgag</i> 481 <i>tccttggaa aaggctactc tgatggaggg tgctacgagc aactttttgt ctctcctgag</i> 541 <i>gtgtttgtga ctctgggtgt catcagcttg ttggagaata tcttagtgat tgtggcaata</i> 601 <i>gccaaagaaca agaactctga ttcacccatg tactttttca tctgcagctt ggctgtggct</i> 661 <i>gatatgctgg tgagcgttc aatggatca gaaaccatta tcatcacctt attaaacagt</i>	390 bp
Τμήμα 2 661 <i>gatatgctgg tgagcgttc aatggatca gaaaccatta tcatcacctt attaaacagt</i> 721 <i>acagatacgg atgcacagag ttccacagt aatattgata atgtcattga ctcggtgac</i> 781 <i>tgtagctcct tgcttgcatc cattgcagc ctgctttcaa ttgcagtga caggacttt</i> 841 <i>actatcttct atgctctcca gtaccataac attatgacag ttaagcgggt tgggatcagc</i> 901 <i>ataagttgta tctgggcagc ttgcacggtt tcaggcattt tgttcatcat ttactcagat</i> 961 <i>agtagtgctg tcatcatctg cctcatcacc atgttcttca ccatgctgga tctcatggt</i>	346 bp
Τμήμα 3 901 <i>ataagttgta tctgggcagc ttgcacggtt tcaggcattt tgttcatcat ttactcagat</i> 961 <i>agtagtgctg tcatcatctg cctcatcacc atgttcttca ccatgctgga tctcatggt</i> 1021 <i>tctctctatg tccacatggt cctgatggcc aggccttaca ttaagaggat tgctgtcctc</i> 1081 <i>cccggcactg gtgccatccg ccaagggtgcc aatatgaagg gagcgattac cttgaccatc</i> 1141 <i>ctgattggcg tctttgtgtg ctgctgggcc ccattcttcc tccacttaat attctacatc</i> 1201 <i>tctgtcctc agaatccata ttgtgtgtgc tcatgtctc actttaactt gtatctcata</i>	331 bp
Τμήμα 4 1141 <i>ctgattggcg tctttgtgtg ctgctgggcc ccattcttcc tccacttaat attctacatc</i> 1201 <i>tctgtcctc agaatccata ttgtgtgtgc tcatgtctc actttaactt gtatctcata</i> 1261 <i>ctgatcatgt gtaattcaat catgacatc ctgatttatg cactccggag tcaagaactg</i> 1321 <i>aggaaaacct tcaaagagat catctgttgc tatcccttgg gaggcctttg tgacttgtct</i> 1381 <i>agcagatatt aatgggggac agagcacgca atataggaac atgcataaga gacttttca</i>	285 bp

2.2.7.2. Πρωτόκολλο PCR

Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε δείγμα είναι :

• MgCl ₂	1 μL
• PCR Buffer	2,5 μL
• DNTP's	0,2 μL
• Αριστερός εκκινητής	0,4 μL
• Δεξιός εκκινητής	0,4 μL
• Taq Πολυμεράση (Dynazyme)	1 μL
• Αποστειρωμένο νερό	18,5 μL
• Δείγμα DNA	1μL

Για την επιλογή της κατάλληλης θερμοκρασίας που πραγματοποιείται η σύνδεση των εκκινητών (primer annealing) ακολουθείται για κάθε τμήμα η διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε εύρος διαφορετικών θερμοκρασιών (PCR gradient). Το εύρος των θερμοκρασιών που δοκιμάστηκαν για τον προσδιορισμό της κατάλληλης θερμοκρασίας σύνδεσης των εκκινητών ήταν από 55⁰C έως 72⁰C.

Η διαδικασία της PCR ακολουθεί το παρακάτω πρόγραμμα :

Η διαδικασία της PCR ακολουθεί το παρακάτω πρόγραμμα :

Βήμα

1	Αποδιάταξη	95 °C	5min
2		94 °C	1 min
3	Σύνδεση	Θερμοκρασία υβριδοποίησης	5min
4		Βήμα 2	40 φορές
5	Επιμήκυνση	72 °C	10
6		99 °C	7
7		65 °C	1h
8		37 °C	1h
9		4 °C	

Σε κάθε εφαρμογή της PCR, συγχρόνως με τα δείγματα DNA χρησιμοποιείται επιπλέον ένας “μάρτυρας” που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από DNA, προκειμένου να ελέγχεται τυχόν μόλυνση των δειγμάτων.

2.2.8. Έλεγχος της PCR

Ο έλεγχος της επιτυχίας της PCR γίνεται με ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Για την εμφάνιση των προϊόντων προστίθεται στο πήκτωμα βρωμιούχο αιθίδιο το οποίο έχει την ιδιότητα να φωσφορίζει στο υπεριώδες φως. Η εκτίμηση του μεγέθους των προϊόντων της PCR έγινε με τη χρήση μάρτυρα (Ladder) μεγέθους 100 bp. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης έχει ως εξής :

1. Παρασκευάζεται πήκτωμα αγαρόζης με ανάμιξη σε κωνική φιάλη 50ml διαλύματος TBE (0.5x) και 1gr αγαρόζης. Το διάλυμα θερμαίνεται έως ότου γίνει διαυγές.
2. Αφού κρυώσει το διάλυμα προστίθενται 3 μl βρωμιούχο αιθίδιο.
3. Το διάλυμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, αφού πρώτα έχουν προσαρμοστεί οι “χτένες”.
4. Όταν στερεοποιηθεί το πήκτωμα προστίθενται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης 250 ml διαλύματος TBE (0.5 x).
5. Η προετοιμασία των δειγμάτων γίνεται αναμιγνύοντας 5 μl από το προϊόν της PCR με 2 μl χρωστικής.
6. Μεταφέρονται σε κάθε πηγάδι τα παραπάνω δείγματα και σε ένα από τα πηγάδια τοποθετείται ένας μάρτυρας (DNA Ladder 100 bp).
7. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 150 Volts για χρονικό διάστημα περίπου 20 λεπτών.
8. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα παρατηρείται στο υπεριώδες φως και συγκρίνεται το μήκος κάθε ζώνης σε σχέση με το μάρτυρα.

2.2.9. Ηλεκτροφόρηση με κλίση αποδιατακτικών παραγόντων (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης με κλίση αποδιατακτικών παραγόντων (DGGE) αναφέρεται στην ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε πηκτώματα πολυμερισμένης ακρυλαμίδης στα οποία υφίσταται κλίση αποδιατακτικών παραγόντων. Με την τεχνική αυτή συνδυάζεται η ηλεκτροφόρηση με την ταυτόχρονη αποδιάταξη του DNA (“τήξη”) και μετατροπή της διπλής έλικας σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες. Έτσι, είναι δυνατόν να διαχωριστούν δύο αλυσίδες DNA με το ίδιο μέγεθος, εάν αυτές διαφέρουν έστω και σε μία βάση, καθώς έχουν διαφορετική συμπεριφορά τήξης, με αποτέλεσμα να αντιμετωπίζουν διαφορετική αντίσταση μέσα στο πηκτώμα. Την αποδιάταξη ενός τμήματος DNA καθορίζει η περιεκτικότητα της σε ζεύγη κυτοσίνης -γουανίνης (ποσοστό % σε GC).

Μία από τις εφαρμογές της είναι η ανίχνευση πολυμορφισμών και μεταλλάξεων. Η εικόνα που λαμβάνεται στην DGGE για ένα ομόζυγο φυσιολογικό άτομο είναι μία ζώνη σε συγκεκριμένο ύψος του πηκτώματος. Η εικόνα ενός ομόζυγου για κάποια μετάλλαξη ατόμου είναι και πάλι μία ζώνη, η οποία εστιάζεται σε διαφορετικό σημείο του πηκτώματος. Στους ετεροζυγώτες η εικόνα εμφανίζει τέσσερις διαφορετικές ζώνες, κάθε μία από τις οποίες οφείλεται σε διαφορετικό τύπο μορίου. Συγκεκριμένα, η μία ζώνη αντιστοιχεί στο φυσιολογικό DNA, η δεύτερη στο μεταλλαγμένο, ενώ οι άλλες δύο στον ετερόζυγο συνδυασμό των συμπληρωματικών αλυσίδων DNA (ετεροδιμερή).

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε κλίση αποδιατακτικών παραγόντων 20 -50%.

2.2.9.1. Παρασκευή πηκτώματος ακρυλαμίδης

1. Καθαρίζονται προσεκτικά τα τζάμια που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του πηκτώματος με αιθανόλη.
2. Σχηματίζεται το καλούπι για την παρασκευή του πηκτώματος, τοποθετώντας ανάμεσα στα δυο τζάμια τα spacers” (sandwich).
3. Τα σημεία στα οποία ενώνονται τα τζάμια καλύπτονται με ταινία για να μην υπάρξει διαρροή του διαλύματος ακρυλαμίδης όσο είναι σε ρευστή μορφή. Το καλούπι εφαρμόζεται και σταθεροποιείται σε ειδική βάση.
4. Παρασκευάζονται τα αποδιατακτικά διαλύματα 20% και 50%.

5. Με τη χρήση ειδικής συσκευής εισάγονται στο χώρο μεταξύ των δύο τζαμιών τα αποδιατακτικά διαλύματα, πρώτα το διάλυμα συγκέντρωσης 50% και στη συνέχεια 20%.
6. Μετά την πλήρωση του καλουπιού στην κορυφή του τοποθετείται “χτένα” για το σχηματισμό των “πηγαδιών” του πηκτώματος όπου θα τοποθετηθεί το δείγμα.
7. Το πηκτώμα αφήνεται να πολυμεριστεί τουλάχιστον 1 ώρα και στη συνέχεια αφαιρείται η “χτένα”.

2.2.9.2 Προετοιμασία δειγμάτων και ηλεκτροφόρηση

1. Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης τοποθετείται διάλυμα διάλυμα TAE έως τη γραμμή πλήρωσης του δοχείου και ενεργοποιείται το σύστημα θέρμανσης, το οποίο ρυθμίζεται στους 60 °C.
2. Αφαιρούνται οι ταινίες από το καλούπι και αυτό προσαρμόζεται στη βάση στήριξης της συσκευής ηλεκτροφόρησης.
3. Με μία πλαστική σύριγγα ξεπλένονται τα πηγάδια του πηκτώματος με TAE.
4. Τα προϊόντα της PCR (8μl) αναμιγνύονται με 3 μl χρωστικής.
5. “Φορτώνονται” τα δείγματα στα “πηγάδια” του πηκτώματος με αυτόματη πιπέτα.
6. Ηλεκτροφόρηση στα 30V για 20 ώρες.

2.2.9.3. Χρώση και παρατήρηση πηκτώματος

Το πηκτώμα τοποθετείται σε διάλυμα TAE που περιέχει τη χρωστική Cyber Gold (100μl/ L) για 15 min σε σκοτεινό χώρο. Μετά τη χρώση παρατηρείται στο υπεριώδες όπου φαίνονται τα τμήματα του DNA με τη μορφή ζωνών.

2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.3.1.Υπολογισμός της συγκέντρωσης του DNA

Με τη διαδικασία φωτομέτρησης εκτιμήθηκε η συγκέντρωση DNA στα δείγματα. Τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης φαίνονται στον πίνακα. :

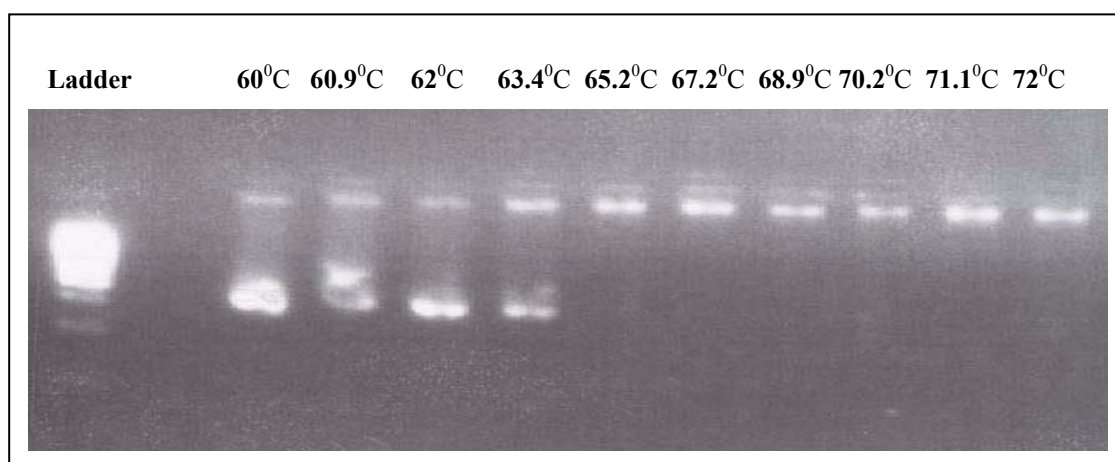
A/A	Δείγμα	Απορρόφηση	Συγκέντρωση DNA	OD260/OD280
1	A1	0,2475	247 ng/μl	1,051
2	A2	0,0050	-	-
3	A3	0,0050	-	-
4	A4	0,4039	403 ng/μl	1,26
5	B1	0,0050	-	-
6	B2	0,17	170 ng/μl	1,74
7	B3	0,2085	208 ng/μl	1,62
8	C1	0,3083	308 ng/μl	1,58
9	C2	0,1489	148 ng/μl	1,81
10	C3	0,2022	202 ng/μl	1,74
11	D1	0,4738	473 ng/μl	1,64
12	D2	0,2055	205 ng/μl	1,61
13	D3	0,3935	393 ng/μl	1,56
14	D4	0,1896	189 ng/μl	1,67
15	E1	0,2445	244 ng/μl	1,61
16	E2	0,4850	485 ng/μl	1,34
17	E3	0,2432	243 ng/μl	1,52
18	E4	0,0350	35 ng/μl	1,41
19	F1	0,636	636 ng/μl	1,28
20	F2	0,1976	197 ng/μl	1,7
21	F3	0,3885	388 ng/μl	1,28

Πίνακας Error! Unknown switch argument.. Αποτελέσματα της φωτομέτρησης των δειγμάτων DNA

2.3.2. Προσδιορισμός της θερμοκρασίας σύνδεσης εκκινητών

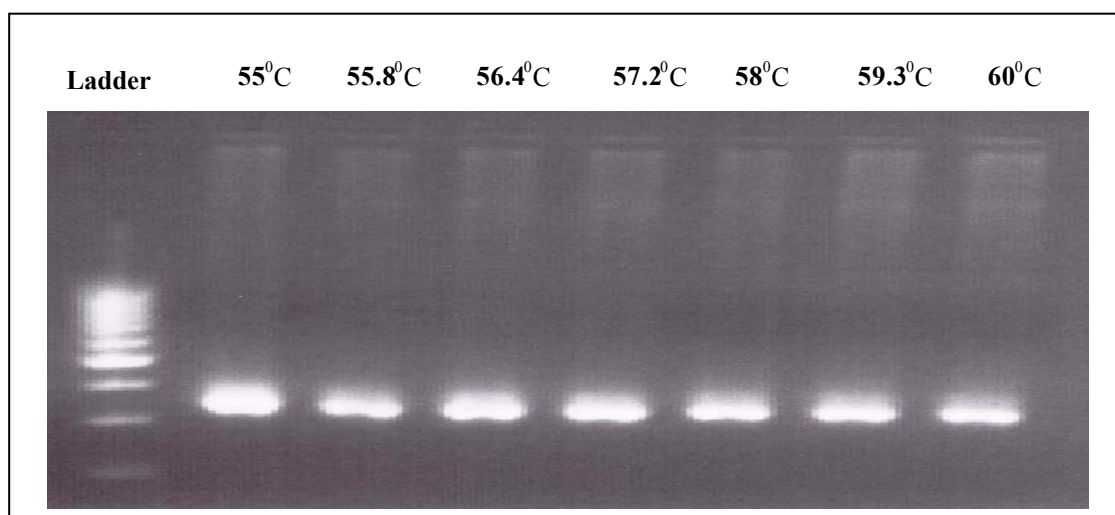
Η επιλογή της κατάλληλης θερμοκρασίας που πραγματοποιείται η σύνδεση των εκκινητών (primer annealing) με τη διαδικασία της PCR σε διάφορες θερμοκρασίες (PCR gradient) έδωσε τα εξής αποτελέσματα για κάθε εξόνιο :

Τμήμα 1 : Επελέγη η θερμοκρασία 62 °C.



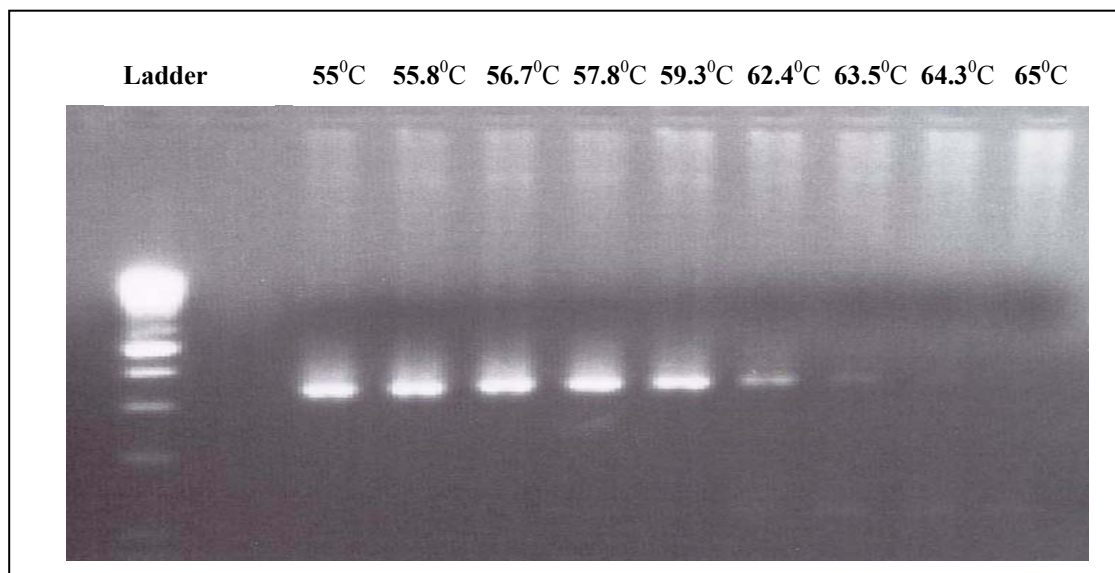
Εικόνα 5. Προϊόντα της PCR Gradient για το τμήμα 1 του γονιδίου.

Τμήμα 2 : Επελέγη η θερμοκρασία 58 °C.



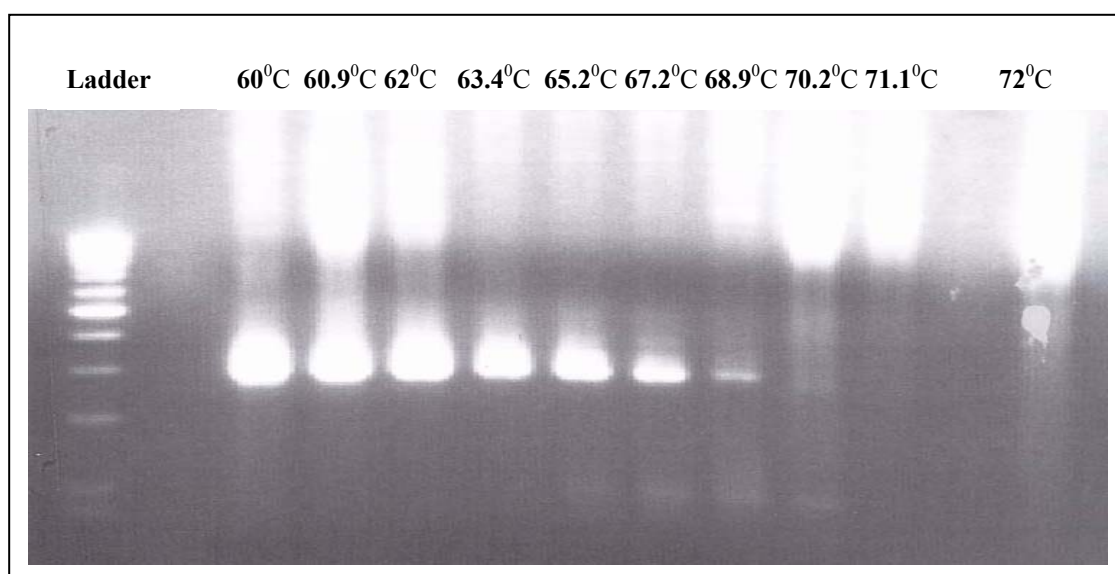
Εικόνα 6. Προϊόντα της PCR Gradient για το τμήμα 2 του γονιδίου.

Τμήμα 3 : Επελέγη η θερμοκρασία 58 °C.



Εικόνα 7. Προϊόντα της PCR Gradient για το τμήμα 3 του γονιδίου.

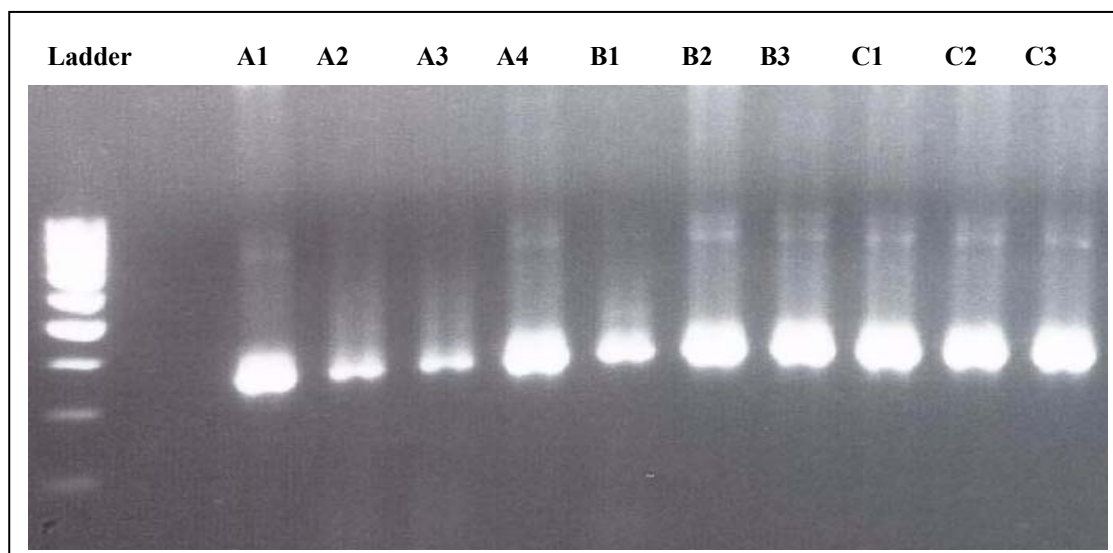
Τμήμα 4 : Επελέγη η θερμοκρασία 67.2 °C.



Εικόνα 8. Προϊόντα της PCR Gradient για το τμήμα 4 του γονιδίου.

2.3.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

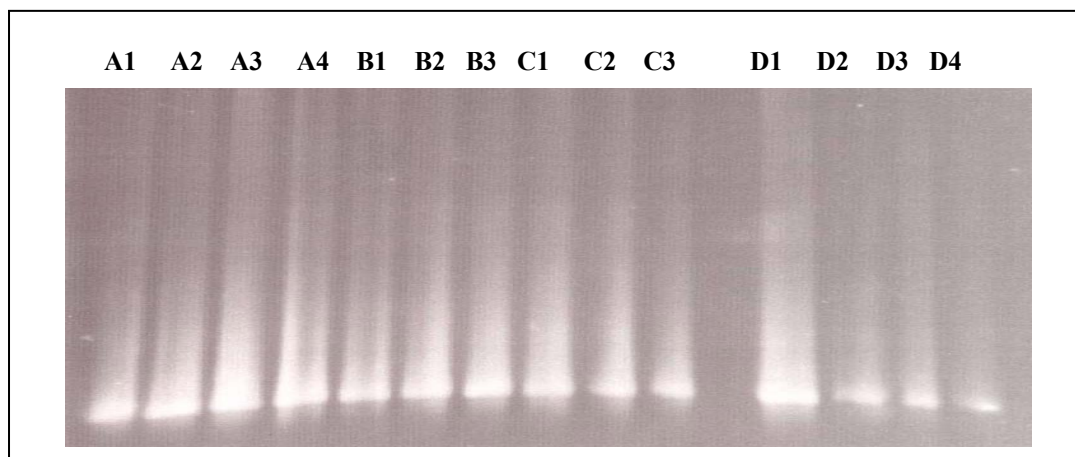
Παρά τον επιτυχή καθορισμό της κατάλληλης θερμοκρασίας σύνδεσης εκκινητών και για τα τέσσερα τμήματα, η παραλαβή προϊόντων της PCR για όλα τα δείγματα έγινε δυνατή μόνο για το τμήμα 2. Για τα υπόλοιπα τμήματα η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης δεν ήταν επιτυχής.



Εικόνα 9. Παράδειγμα προϊόντων της PCR για το τμήμα 2 (δείγματα A1 -C3).

3.4. Ηλεκτροφόρηση με κλίση αποδιατακτικών παραγόντων (DGGE)

Για τα προϊόντα της PCR του τμήματος 2 πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση με κλίση αποδιατακτικών παραγόντων, όπως αυτή περιεγράφη προηγουμένως, σε πήκτωμα κλίσης 20%-50%. Στο δείγμα των ατόμων που συμμετείχαν δεν ανιχνεύθηκε κανένας πολυμορφισμός.



Εικόνα 10. Παράδειγμα ηλεκτροφόρησης DGGE για το τμήμα 2 (δείγματα A1 -D4).

Τα συνολικά αποτελέσματα του πειράματος φαίνονται στον πίνακα :

Τμήμα γονιδίου	Θερμοκρασία Υβριδισμού	Κλίση πηκτώματος DGGE
1	62 °C	-
2	58 °C	20-50%
3	58 °C	-
4	67.2 °C	-

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η πρόσληψη της τροφής, η ενεργειακή ομοιόσταση και η εναπόθεση του σωματικού λίπους ελέγχεται από έναν πολύπλοκο μηχανισμό με επίκεντρο το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, μέλος του οποίου είναι και το σύστημα των βιοενεργών πεπτιδίων που ονομάζονται μελανοκορτίνες. Τα μόρια αυτά, μέσω των υποδοχέων τους, που ανήκουν στην "υπεροικογένεια" των G-συνδεδεμένων υποδοχέων, ρυθμίζουν πολλές φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού.

Ο υποδοχέας 4 των μελανοκορτινών (MC4R) φαίνεται από τις μέχρι σήμερα μελέτες ότι αποτελεί σημαντικό κρίκο στην αλυσίδα των παραγόντων που ευθύνονται για την εμφάνιση της παχυσαρκίας, ιδιαίτερα κατά την παιδική και εφηβική ηλικία. Μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα και έχουν σαν αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης ή/και της λειτουργικότητας του, θεωρείται ότι μπορεί να ευθύνονται για ποσοστά παχυσαρκίας από 0.5 έως και 6% παγκοσμίως. Πέρα από την εκδήλωση υπερβολικής παχυσαρκίας, δεν υπάρχουν άλλες σταθερές φαινοτυπικές εκδηλώσεις των μεταλλάξεων αυτών. Παρ' όλα αυτά υπάρχουν ενδείξεις για την εμπλοκή του υποδοχέα MC4R και σε συμπεριφορές που παίζουν ρόλο στον έλεγχο του σωματικού βάρους, όπως υπερφαγία, διαταραχές της πρόσληψης τροφής αλλά και στον τύπο της κατανομής του σωματικού λίπους. Η μειωμένη διεισδυτικότητα και η ποικίλη εκφραστικότητα των μεταλλάξεων του υποδοχέα MC4R απαντάται σε άλλες περιπτώσεις νόσων που σχετίζονται με υποδοχείς συνδεδεμένους με G-πρωτεΐνες.

Από το 1993 όπου και κλωνοποιήθηκε το γονίδιο MC4R έρευνες σχετικά με την εμφάνιση πολυμορφισμών έχουν γίνει σε δείγματα ατόμων από διάφορες χώρες, που προέρχονταν κυρίως από ευρωπαϊκούς πληθυσμούς. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί 46 διαφορετικές μεταλλάξεις του υποδοχέα που σχετίζονται με την παχυσαρκία. Οι περισσότερες έχουν ανιχνευθεί σε ετεροζυγώτες και ελάχιστες αφορούν σε ομόζυγους φορείς. Οι μελέτες όπου ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις του γονιδίου σε ευρωπαϊκούς πληθυσμούς αφορούν σε λευκούς Βρετανικής καταγωγής (Gotoda *et.al.*, 1997, Farooqi *et.al.*, 2000), σε άτομα γαλλικής (Vaisse *et al.*, 2000, Dubern *et.al.*, 2001), γερμανικής (Hinney *et.al.*, 1999) και σουηδικής καταγωγής (Jacobson *et.al.*, 2002). Επίσης, μεταλλάξεις έχουν ανιχνευθεί σε άτομα τουρκικής (Mergen *et.al.*, 2001), ιαπωνικής (Kobayashi, 2002) και πακιστανικής καταγωγής (Farooqi *et.al.*, 2000).

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο του υποδοχέα της μελανοκορτίνης 4 (MC4R) σε δείγμα ελλήνων παχύσαρκων παιδιών με τη χρήση της τεχνικής DGGE (ηλεκτροφόρηση κλίσης με αποδιατακτικούς παράγοντες). Η ηλεκτροφόρηση κλίσης με αποδιατακτικούς παράγοντες είναι μια εύχρηστη τεχνική που επιτρέπει την ανίχνευση μεταλλάξεων με μεγάλη ευαισθησία. Στην παρούσα μελέτη δεν ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις στο τμήμα του γονιδίου του υποδοχέα MC4R για τα δείγματα που εξετάστηκαν. Στα τμήματα του γονιδίου που δεν έγινε δυνατή η μελέτη τους με τη χρήση της DGGE, αυτό οφείλεται στην αδυναμία παραλαβής προϊόντων από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Οι λόγοι μη επιτυχημένης διεξαγωγής της PCR δεν έχουν καθοριστεί. Για την επίλυση του προβλήματος αυτού ελέγχθηκαν στη συνέχεια όλα τα αντιδραστήρια της PCR, από τον έλεγχο αυτό όμως δεν βρέθηκε κάποια πιθανή αιτία του προβλήματος.

Στην Ελλάδα δεν υπάρχουν έως σήμερα στοιχεία μεταλλάξεων στο γονίδιο του υποδοχέα MC4R. Η ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου MC4R σε ελληνικό πληθυσμό παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον και χρήζει περαιτέρω έρευνας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abdel - Malek, ZA. Melanocortin receptors : their functions and regulation by physiological agonists and antagonists. CMLS 2001; 58 : 434-441.
2. Boutin P, Froguel P. Genetics of human obesity. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2001 Sep; 15(3):391-404.
3. Chen D and Garg A. Monogenic disorders of obesity and body fat distribution. Journal of Lipid Research, 1999. Volume 40, pp. 1735-1746.
4. Chiesi M, Huppertz C and Hofbauer K. Pharmacotherapy of obesity : targets and perspectives. Trends in pharmacological Sciences, 2001. Vol. 22, No. 5.
5. Clement K, Ferri P. Genetics and the Pathophysiology of Obesity. Pediatric Research 2003. Vol 53, No 5 : 721-5.
6. Cody JC, Reveles XT, Hale DE, Lehman D, Coon H, Leach R. Haplosufficiency of the melanocortin -4 receptor gene in individuals with deletions of 18q. Hum Genet 1999; 105: 424-427.
7. Cone RD. The Central Melanocortin System and Energy Homeostasis. 1999, TEM Vol. 10, No. 6.
8. Cone RD. Haploinsufficiency of the melanocortin-4 receptor : part of a thrifty genotype ? The Journal of Clinical investigation 2000 July ; 106 (2) : 185 -87.
9. Dubern B, Clement K, Pelloux V, Froguel P, Girardet JP, Guy-Grand B, Tounian P. Mutational analysis of melanocortin-4 receptor, agouti-related protein, and alpha-melanocyte-stimulating hormone genes in severely obese children. J Pediatr. 2001 Aug; 139(2):204-9.
10. Farooqi IS, Yeo GS, Keogh JM, Aminian S, Jebb SA, Butler G, Cheetham T, and O'Rahilly S. Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. The Journal of Clinical investigation, 2000. July, Volume 106, Number 2.
11. Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GS, Lank EJ, Cheetham T, O'Rahilly S. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. N Engl J Med. 2003 Mar 20;348(12):1085-95.
12. Gantz I, Miwa H., Konda Y., Shimoto Y., Tashiro T., Watson S.J., DelValle J., Yamada T. Molecular Cloning, Expression and Gene Localization of a Fourth Melanocortin Receptor. 1993, The Journal of Biological Chemistry. Vol. 268, No 20, July, pp.15174-15179.

13. Graham KS, Leibel RL. Yellow mice, red hair and childhood obesity : The melanocortinogenic pathway in energy homeostasis. *J Pediatr.* 2001 Aug; 139(2): 177-181.
14. Hinney A, Schmidt A, Nottebom K, Heibult O, Becker I, Ziegler A, Gerber G, Sina M, Gorg T, Mayer H, Siegfried W, Fichter M, Remschmidt H, Hebebrand J. Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Apr; 84(4):1483-6.
15. Ho G, MacKenzie RG. Functional characterization of mutations in melanocortin -4 receptor associated with human obesity. *The Journal of Biological Chemistry* 1999 December 10 ; 274 (50) : 35816-35822.
16. Jacobson et al. Melanocortin-4 receptor sequence variations are seldom a cause of human obesity : the Swedish Obese Subjects, the HERITAGE Family Study, and a Memphis cohort. *J. clin. Endocrinol. Metab.* 2002, 87 (10), 4442-4446.
17. Kim CS, Lee SH, Kim RY, Kim BJ, Li SZ, Lee IH, Lee EJ, Lim SK, Bae Ys, Lee W and Baik JH. Identification of domains directing specificity of coupling to G-proteins for the melanocortin MC3 and MC4 receptors. *The Journal of Biological Chemistry* 2002, August 30 ; 277 (35) : 31310-31317.
18. Kobayashi H, Ogawa Y, Shintani M, Ebihara K, Shimodahira M, Iwakura T, Hino M, Ishihara T, Ikekubo K, Kurahachi H, Nakao K. A Novel homozygous missense mutation of melanocortin-4 receptor (MC4R) in a Japanese woman with severe obesity. *Diabetes.* 2002 Jan;51(1):243-6.
19. Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G & Gróter A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nature genetics*, 1998. June, Volume 19.
20. Lubrano-Berthelier C, Cavazos M, Le Stunff C, Haas K, Shapiro A, Zhang S, Bougneres P, Vaisse C. The human MC4R promoter: characterization and role in obesity. *Diabetes.* 2003 Dec; 52 (12):2996-3000.
21. Lubrano-Berthelier C, Durand E, Dubern B, Shapiro A, Dazin P, Weilli J, Ferron C, Froguel P, Vaisse C. Intracellular retention is a common characteristic of childhood obesity-associated MC4R mutations. *Human Molecular Genetics* 2003. Vol 12, No2.

22. MacNeil D, Howard A, Guan X, Fong T, Nargund R, Bednarek M, Goulet M, Weinberg D, Strack A, Marsh D, Chen H, Shen C, Chen A, Rosenblum C, MacNeil T, Tota M, MacIntyre E, Van der Ploeg L. The role of melanocortins in body weight regulation: opportunities for the treatment of obesity. *Eur J Pharmacol.* 2002 Aug 16;450(1):93.
23. Mergen M, Mergen H, Ozata M, Oner R, Oner C. A novel melanocortin 4 receptor (MC4R) gene mutation associated with morbid obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Jul; 86(7):3448.
24. Miraglia, D G et al. Low frequency of melanocortin -4 receptor mutations in a Mediterranean population with early-onset obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2002, 26 (5), 647-651.
25. Nijenhuis, W, Garner K, van Rozen R J, Adan R A H. Poor Cell Surface Expression of Human Melanocortin-4 Receptor mutations Associated with Obesity. *The Journal of Biological Chemistry.* 2003 Vol.278, No 25, June 20 : 22939-22945.
26. Porte D., Seeley Rj, Woods Sc, Baskin DG, Figlewicz DP and Schwartz M. Obesity, diabetes and the central nervous system. *Diabetologia*, 1998. 41: 863-881.
27. Rosmond R, Chagnon M, Bouchard C, Bjorntorp P. A missense mutation in the human melanocortin-4 receptor gene in relation to abdominal obesity and salivary cortisol. *Diabetologia.* 2001 Oct; 44(10):1335-8.
28. Samama P, Rumenik L and Grippo J. The melanocortin receptor MC4R controls fat consumption. *Regulatory Peptides*, 2003. 113, 85-88.
29. Sina M, Hinney A, Ziegler A, Neuport T, Mayer H, Siegfried W, Blum W. F., Remschmidt H, Hebebrand J. Phenotypes in Three Pedigrees with Autosomal Dominant Obesity Caused by haploinsufficiency Mutations in the melanocorti-4 Receptor Gene. *Am. J. Hum. Genet.* 65 : 1501-1507, 1999.
30. Tarnow P, Schöneberg T, Krude H, Gróters and Biebermann H. Mutationally Induced Disulfide Bond Formation within the Third Extracellular Loop causes Melanocortin 4 Receptor Inactivation in Patients with Obesity. *The Journal of Biological chemistry*, 2003. Vol. 278, no. 49. Issue of December 5, pp. 48666-48673.
31. Vaisse C, Clement K, Durand E, Hercberg S, Guy-Grand B, Froguel P. Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest.* 2000 Jul;106(2):253-62.

32. Vanleeuwen D, Steffey ME, Donahue C, Ho G and MacKenzie RG. Cell surface Expression of the Melanocortin-4 receptor Is Dependent on a terminal Di-isoleucine Sequence at codons 316/317. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003. Vol. 278, no. 18. Issue of may 2, pp. 15935-15940.
33. Vergoni AV, Bertolini A. Role of melanocortins in the central control of feeding. *Eur J Pharmacol*. 2000 Sep 29;405(1-3):25-32.
34. Yang Y K, Harmon C M. Recent developments in our understanding of melanocortin system in the regulation of food intake. *Obesity Reviews* 2003 ; 4, 239-248.
35. Yeo GS, Farooqi IS, Challis BG, Jackson RS, O'Rahilly S. The role of melanocortin signalling in the control of body weight : evidence from humans and murine genetic models. *Q J Med* 2000; 93 : 7-14.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

**ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΒΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ 4 ΤΗΣ
ΜΕΛΑΝΟΚΟΠΤΙΝΗΣ**

1 agcttccgag aggcagccga tgtgagcatg tgcgcacaga ttcgtctccc aatggcatgg
 61 cagcttcaag gaaaattatt ttgaacagac ttgaatgcat aagattaaag ttaaagcaga
 121 agtgagaaca agaaagcaaa gagcagactc ttcaactga gaatgaatat ttgaagccc
 181 aagattttaa agtgatgatg attagagtcg tacctaaaag agactaaaaa ctccatgtca
 241 agctctggac ttgtgacatt tactcacagc aggcattggca attttagcct cacaacttc
 301 agacagataa agacttggag gaaataactg agacgactcc ctgaccagg aggttaaate
 361 aattcagggg gacactggaa ttctctgcc agcatggtga actccacca ccgtgggatg
 421 cacactctc tgcacctctg gaaccgcagc agttacagac tgcacagcaa tgccagtga
 481 tcccttgga aaggctactc tgatggaggg tgctacgagc aacttttgt ctctctgag
 541 gtgtttgtga ctctgggtgt catcagctt ttggagaata tcttagtgat tgtggcaata
 601 gccagaaca agaattctga ttcacccatg tacttttca tctgcagctt ggctgtggct
 661 gatagtctgg tgagcgttc aatggatca gaaaccatta tcatcacct attaaacagt
 721 acagatacgg atgcacagag ttccacagt aatattgata atgtcattga ctcggtgatc
 781 ttagtctct tgcctgcac cattgcagc ctgcttcaa ttgcagtga caggacttt
 841 actatctct atgctctcca gtaccataac attatgacag ttaagcgggt tgggatcagc
 901 ataagttga tctgggcagc ttgcacggt tcaggcattt tgtcatcat ttactcagat
 961 agtagtgctg tcatcatctg cctcatcacc atgttctca ccatgctggc tctcatggct
 1021 tctctctatg tccacatgtt cctgatggcc aggttcaca ttaagaggat tgctgtctc
 1081 cccggcactg gtgcatccg ccaaggtgcc aatatgaagg gagcgattac ctgaccatc
 1141 ctgattggcg tctttgtgt ctgctgggcc ccattcttc tccacttaatt attctacatc
 1201 tctgtctc agaatccata ttgtgtgtgc tcatgtctc actttaactt gtatctcata
 1261 ctgatcatgt gtaattcaat catcgatct ctgatttatg cactccggag tcaagaactg
 1321 aggaaaacct tcaaagagat catctgtgc tatccctgg gaggccttg tgactgtct
 1381 agcagatatt aatggggac agagcagca atataggaac atgcataaga gacttttca
 1441 ctcttacct acctgaatat tgaactctg caacagcttt ctctccgtg tagggtactg
 1501 gttgagatat ccattgtga aatttaagcc tatgatttt aatgagaaaa aatgcccagt
 1561 ctctgtatta ttccaatgt catgctactt tttggccat aaaatatgaa tctatgttat
 1621 aggtttagg cactgtggat ttacaaaaag aaaagtcctt attaaaagct t

ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΥΠΟΛΟΧΕΑ 4 ΤΗΣ ΜΕΛΑΝΟΚΟΡΤΙΝΗΣ

1 mvnsthrgmh tslhlwnrss yrlnsnases lgkgysdggc yeqlfvspev fvtlgvisll
 61 enilvivaia knknlhspmy fficslavad mlvsvsngse tivitllnst dtdaqsftvn
 121 idnvidsvic sslasiesl lsiavdryft ifyalqyhni mtvkrvgiii sciwaactvs
 181 gilfiysds saviiclitm fftmlalmas lyvhmflmar lhikriavlp gtgairqgan
 241 mkgaitltil igvfvvwap fflhlifyis cpqnpycvcf mshfnlylil imensiidpl
 301 iyalrsqelr ktfkeiiccy plggldlss ry