

Maciej T. Małecki, Jakub Frey, Tomasz Klupa, Małgorzata Waluś,  
Małgorzata Owczarek, Jacek Sieradzki

Katedra i Klinika Chorób Metabolicznych, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

# Rola mutacji Pro115Gln w genie PPAR $\gamma$ w patogenezie otyłości w populacji małopolskiej

A role of Pro115Gln mutation in the PPAR $\gamma$  gene in the pathogenesis of obesity in a population of Małopolska region

## STRESZCZENIE

**WSTĘP.** PPAR $\gamma$  (*peroxisome — proliferator activated receptor  $\gamma$* ) jest receptorem jądrowym aktywowanym przez czynniki wywołujące proliferację peroksyzomów, w tym przez naturalnie występujące kwasy tłuszczowe i ich pochodne. Jego funkcją jest między innymi regulowanie dojrzewania adipocytów i spichrzania w nich triglicerydów. Mutacje i polimorfizmy tego genu wpływają na powstawanie otyłości i cukrzycy typu 2 u ludzi. Mutacją zmiany sensu, opisaną w populacji niemieckiej, odpowiedzialną za zwiększenie aktywności transkrypcyjnej białka PPAR $\gamma$  i powstanie monogenowej formy otyłości jest substytucja proliny przez glutaminę w pozycji aminokwasowej 115 (Pro115Gln).

**CEL PRACY.** Celem badania jest ocena roli mutacji Pro115Gln w powstawaniu ciężkiej otyłości w populacji Małopolski.

**MATERIAŁ I METODY.** Badanie objęło grupę 89 otyłych osób (60 kobiet i 29 mężczyzn) ze wskaźnikiem masy ciała (BMI, *body mass index*) większym lub równym 35. Wśród badanych było 64 chorych na cukrzycę typu 2 (43 kobiety, 21 mężczyzn). DNA osób

włączonych do badania użyto do namnożenia za pomocą polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR, *polymerase chain reaction*) fragmentu genu PPAR $\gamma$  o długości 129 bp, potencjalnie zawierającego badaną mutację. Mutacji poszukiwano za pomocą techniki zmiennej długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP, *restriction fragment length polymorphism*) przy użyciu enzymu restrykcyjnego *Hinc II*.

**WYNIKI.** W rezultacie przeprowadzonych eksperymentów u żadnej z badanych osób nie stwierdzono obecności miejsca restrykcyjnego dla enzymu *Hinc II*, a zatem żadna z nich nie była nosicielem poszukiwanej mutacji. Aby uzyskać kontrolę aktywności restrykcyjnej enzymu *Hinc II*, namnożono fragment genu receptora 4 melanokortyny (MC4R, *melanocortin-4 receptor*), zawierający kodon 103, wykazujący polimorfizm walina  $\rightarrow$  izoleucyna i zastosowano trawienie enzymem *Hinc II*.

**WNIOSKI.** Z przeprowadzonych badań wynika, że mutacja Pro115Gln w genie PPAR $\gamma$  nie jest częstą przyczyną ciężkiej otyłości w populacji Małopolski.

Słowa kluczowe: PPAR $\gamma$ , gen, otyłość

## ABSTRACT

**INTRODUCTION.** PPAR $\gamma$  is a nuclear receptor that is activated by factors, fatty acids for example, that influence the activation of peroxisomes. Its function is, among others, the regulation of adipocyte differentiation and triglyceride storage. Mutations and polymorphisms of this gene influence the pathogenesis of obesity and type 2 diabetes mellitus in humans. Recently, a substitution of proline by gluta-

Adres do korespondencji: Prof. dr hab. Jacek Sieradzki  
Katedra i Klinika Chorób Metabolicznych  
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego  
ul. Kopernika 15, 31-501 Kraków  
e-mail: mmsierad@cyf-kr.edu.pl

Praca powstała dzięki wsparciu finansowemu Collegium Medicum UJ (Grant 501/KL/439/L) oraz NIH (Grant FIRCA 1 R03 TW01351-01).

Diabetologia Praktyczna 2002, tom 3, nr 4, 227-231

Copyright ©2002 Via Medica

Nadesłano: 15.09.02      Przyjęto do druku: 20.10.02

mine at residue 115 of the PPAR $\gamma$  gene has been described in a German population. This Pro115Gln missense mutation caused increased transcriptional activity of the protein and occurrence of monogenic form of obesity.

**AIM OF STUDY.** In the current study we aimed to identify the role of Pro115Gln mutation in the pathogenesis of severe obesity in Małopolska region.

**MATERIAL AND METHODS.** We included into this study 89 obese individuals with BMI (body mass index) equal or above 35 (60 women and 29 men). There were 64 type 2 diabetes patients among them (43 women and 21 men). DNA of these 89 individuals was used to amplify, through polymerase chain reaction (PCR), a 129 base pair DNA fragment that could potentially contain the examined mutation. Screening for the Pro114Gln mutation was performed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) method using *Hinc II* restriction enzyme.

**RESULTS.** None of the examined samples showed the presence of *Hinc II* restriction site. This constitutes the evidence that our study group did not contain a carrier of the Pro115Gln mutation. To confirm the activity of the *Hinc II* restriction enzyme used in the study we amplified and digested the fragment of melanocortine 4 receptor gene (MC4R) that contained Val103Ile polymorphism creating *Hinc II* restriction site.

**CONCLUSION.** Our study proves that Pro115Gln mutation of the PPAR $\gamma$  gene is not a frequent cause of severe obesity in a population of Małopolska region.

**Key words:** PPAR $\gamma$ , gene, obesity

## Wstęp

Otyłość, z etiologicznego punktu widzenia, jest zróżnicowaną grupą zaburzeń, których wiodącym objawem jest nadmiar tkanki tłuszczowej [1, 2]. Stanowi ona czynnik ryzyka cukrzycy typu 2, zaburzeń lipidowych, nadciśnienia tętniczego i choroby niedokrwiennej serca [1]. W patogenezie otyłości istotną rolę odgrywają czynniki genetyczne i środowiskowe. Za znaczeniem czynników genetycznych przemawia występowanie otyłości w rodzinach, duża zgodność zachorowalności u bliźniąt monozygotycznych oraz bardzo wysoka chorobowość w niektórych grupach etnicznych, na przykład u Indian Pima [3]. Roli czynników środowiskowych dowodzi zależność występowania otyłości od diety i trybu życia oraz różnica w występowaniu schorzenia w tych samych grupach etnicznych, żyjących w różnych warunkach środowiskowych [4, 5]. W otyłości, z etiopatogenetyczne-

go punktu widzenia, można wyodrębnić dwie podstawowe grupy: formy złożone i formy monogenowe [2]. Postacie złożone powstają wskutek działania wielu różnych czynników. W pierwszym rzędzie powstają w wyniku interakcji środowiska i podłoża genetycznego, ale także wzajemnego oddziaływania różnych genów. Do złożonych postaci otyłości predysponują stosunkowo częste polimorfizmy. Allele tych polimorfizmów występują zarówno u ludzi bez otyłości, jak i u osób wykazujących jej cechy. Nosicielstwo niektórych alleli wiąże się raczej z umiarkowanym wzrostem ryzyka zachorowania niż z bardzo wysokim prawdopodobieństwem pojawienia się choroby, jednak ze względu na ich częstość, rola w odniesieniu do całej populacji bywa bardzo znacząca. Diagnoza z reguły dotyczy osób dorosłych, często w drugiej połowie życia [6]. Przykładem takiego polimorfizmu jest substytucja -866G/A w promotorze genu białka rozsprzęgającego 2 (UCP2, *uncoupling protein 2*) [7]. Formy monogenowe stanowią mniejszość szacowaną na około 5–10% wszystkich przypadków, jednak ich podłoże genetyczne jest stosunkowo dobrze poznane, a badania nad nimi wniosły wiele istotnych elementów do zrozumienia patogenezy choroby. Są one konsekwencją rzadkich mutacji w pojedynczych genach. Mutacje te znacząco zmieniają strukturę i funkcję białek. Formy monogenowe charakteryzują się z reguły wysoką penetracją fenotypową, ciężkim, często dramatycznym obrazem klinicznym i są przyczyną wystąpienia choroby u osób w młodym wieku [1]. Podłoże genetyczne ma w tych przypadkach decydujące znaczenie, a środowisko nie zmienia w istotny sposób jego wpływów. W ostatnich latach opisano mutacje w kilku genach, będące przyczynami monogenowych form otyłości: leptyny, receptora leptyny, pro-opiomelanokortyny (POMC, *pro-opiomelanocortine*), konwertazy prohormonalnej 1 (PC-1, *prohormone convertase 1*), receptora melanokortyny typu 4 (MC4R, *melanocortin-4 receptor*) [8–15]. Odrębną postacią monogenową, niezwiązaną z układem leptyny, są przypadki będące konsekwencją mutacji genu peroksysomalnego aktywowanego proliferacyjnie receptora  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ , *peroxisome — proliferator activated receptor*) [16]. Receptor ten należy do rodziny receptorów jądrowych, aktywowanych przez naturalnie występujące kwasy tłuszczowe i ich pochodne [17] i reguluje on ekspresję genów przez wiązanie się z odpowiednimi sekwencjami DNA, pełniącymi funkcje regulatorowe promotorów (PPRE, *peroxisome — proliferator response elements*) [17]. Receptor PPAR $\gamma$  odpowiada wraz z innymi czynnikami transkrypcyjnymi za różnicowanie fibroblastów w kie-

runku adipocytów [18] oraz wpływa na metabolizm dojrzałych komórek przez regulację ekspresji enzymów. Gen PPAR $\gamma$  zlokalizowany jest na chromosomie 3, u człowieka występują trzy izoformy mRNA dla PPAR $\gamma$ :  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2 i  $\gamma$ 3, powstające przez rozpoczęcie odczytu z różnych miejsc i różne łączenie fragmentów mRNA (*splicing*) [19, 20]. Ludzki PPAR $\gamma$ 2 w stosunku do dwóch pozostałych izoform posiada dodatkowych 28 aminokwasów. Mutacje i polimorfizmy genu PPAR $\gamma$  są związane u człowieka z chorobami metabolicznymi. Częstszy wariant powszechnego polimorfizmu Pro12Ala wiąże się ze zwiększonym ryzykiem cukrzycy typu 2 [21]. Dotychczasowe publikacje nie pozwalają na jednoznaczne powiązanie tego polimorfizmu z powstawaniem otyłości [22]. Rzadkie mutacje Val1290Met i Pro467Leu wykryto w rodzinach obciążonych ciężkimi postaciami insulinooporności [23]. Ostatnio wykryto substytucję G $\rightarrow$ T powodującą mutację zmiany sensu Pro115Gln w pozycji 115 łańcucha aminokwasowego PPAR $\gamma$ 2, którą opisano w populacji niemieckiej jako odpowiedzialną za około 3% ciężkiej otyłości [16]. Mutacja ta uniemożliwia fosforylację seryny w pozycji 114 i powoduje wzrost funkcji tego receptora, co *in vivo* powoduje hiperplazję adipocytów oraz gromadzenie w nich triglicerydów [16].

Celem pracy było zbadanie znaczenia mutacji Pro115Gln w genie PPAR $\gamma$  u osób z ciężką otyłością w populacji Małopolski.

## Metody

### Badana populacja

Wstępnej analizie pod kątem zakwalifikowania do badania poddano 658 niespokrewnionych osób: 398 chorych na cukrzycę typu 2 i 260 osób bez cukrzycy (podczas rekrutacji zastosowano kryteria i definicje cukrzycy wg WHO [24]), które włączono do badań nad podłożem genetycznym chorób metabolicznych w Katedrze i Klinice Chorób Metabolicznych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego [25, 26]. Wszystkie osoby włączone do badania były rasy kaukaskiej i pochodziły z Małopolski. Przeszły one podstawowe badanie fizykalne, które obejmowało między innymi: pomiary wzrostu, masy ciała i ciśnienia tętniczego. Badanie objęło głównie pacjentów ambulatoryjnych Katedry i Kliniki Chorób Metabolicznych, ich małżonków oraz ochotników z personelu tej placówki akademickiej. Wybrano spośród nich 89 osób otyłych ze wskaźnikiem masy ciała (BMI, *body mass index*) większym lub równym 35. W tej grupie było 64 chorych na cukrzycę typu 2 (43 kobiety i 21 mężczyzn) i 25 osób z prawidłową glikemią

na czczo (17 kobiet i 8 mężczyzn). Badanie przeprowadzono zgodnie z zasadami Deklaracji Helsińskiej. Zostało ono zaaprobowane przez Komisję Bioetyczną Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego.

### Genotypowanie

DNA badanych osób wyizolowano z limfocytów krwi obwodowej za pomocą odczynnika DNAzol (Gibco). Tego DNA i primerów o strukturze: sensowny — 5'-tgc aat caa agt gga gcc-3', antysensowny — 5'-cag aag ctt tat ctc cac aga c-3' użyto do namnożenia DNA obejmującego *locus* badanej mutacji. Polimerazowa reakcja łańcuchowa (PCR, *polymerase chain reaction*) została wykonana w termocyklerze Uno II (Biometra). Temperatura przyłączania (*annealing*) wynosiła 60°C, program obejmował 35 cykli. Całkowita długość PCR produktu wynosiła 129 par zasad (bp, *base pairs*). Produkt PCR podlegał trawieniu przy użyciu swoistego enzymu restrykcyjnego *Hinc II* zgodnie z instrukcjami wytwórcy (Fermentas). W obecności wariantu glutaminy oczekiwane trawienie powinno spowodować odcięcie krótkiego fragmentu o długości 25 bp. Produkty trawienia zostały rozdzielone i uwidocznione na żelu agarozowym o stężeniu 3,5%, barwionym bromkiem etydyny. Wyniki zarejestrowano przy użyciu kamery cyfrowej i zachowano jako dokumenty komputerowe w programie Vilbert-Lourmant.

### Wyniki

Warianty genu PPAR $\gamma$  zostały ustalone u 89 osób. Wśród nich było 64 chorych na cukrzycę typu 2 (43 mężczyzn i 21 kobiet), średni wiek chorych w czasie badania wynosił 55  $\pm$  8,9 lat, średni wiek w chwili postawienia diagnozy 46,5  $\pm$  9,4 lat, a średni BMI 39,5  $\pm$  4,3 kg/m<sup>2</sup>. Średni wiek pozostałych 25 osób bez cukrzycy (8 mężczyzn i 17 kobiet) w momencie badania wynosił 46,5  $\pm$  10,4 lat, a średni BMI w tej grupie 41,0  $\pm$  6,1 kg/m<sup>2</sup>. Żadna z badanych próbek nie wykazała cech obecności allelu glutaminy w miejscu aminokwasowym 115 genu PPAR $\gamma$ , a wszystkie badane osoby były homozygotami dla allelu prolina. Aby potwierdzić aktywność enzymatyczną zastosowanego enzymu *Hinc II*, namnożono fragment genu receptora 4 melanokortyny, zawierający kodon 103, wykazujący polimorfizm walina  $\rightarrow$  izoleucyna (Val103Ile). Częstszy („dziki”) allel tego polimorfizmu można wykryć przy zastosowaniu w PCR zmodyfikowanego primera (*mismatch primer*) oraz techniki RFLP z trawieniem enzymem *Hinc II* [27, 28]. Autorzy, stosując opisaną uprzednio przez Rosmond i wsp. [28] metodę, wykazali prawidłową aktywność stosowanego przez nich enzymu.

## Dyskusja

W opisywanym badaniu poszukiwano w genie PPAR $\gamma$  mutacji Pro115Gln, która upośledza proces fosforylacji tego receptora i prowadzi do powstania monogenowej formy otyłości. W populacji niemieckiej mutacja ta wydaje się odpowiadać za około 3% ciężkiej otyłości. Średni wskaźnik BMI u 4 osób opisanych przez Ristowa i wsp. [16] jako nosicieli tej mutacji wynosił 41,9. Wśród nich 3 osoby chorowały na cukrzycę typu 2 i z biochemicznego punktu widzenia cechowały się niskim stężeniem insuliny, co zinterpretowano jako dowód dużej insulinowrażliwości. Wydaje się, że alternatywnym sposobem wyjaśnienia tego zjawiska jest współlistnienie upośledzenia funkcji komórek  $\beta$ . Za tą drugą hipotezą przemawia inne doniesienie z Niemiec [29], które opisuje zjawisko insulinoporności potwierdzone metodą hiperinsulinemicznego euglikemicznego klampu u kolejnej osoby będącej nosicielem mutacji Pro115Gln w tej populacji. Autorzy dobierali pacjentów do badania, kierując się charakterystyką kliniczną nosicieli w populacji niemieckiej. Do badania włączono chorych na cukrzycę typu 2 z bardzo znaczną masą ciała (BMI > 35). Do wstępnie wyselekcjonowanej grupy chorych na cukrzycę dołączono osoby otyłe bez zaburzeń metabolizmu glukozy, które w prowadzonych przez autorów badaniach nad genetyką cukrzycy typu 2 wchodziły w skład grupy kontrolnej. Mimo, jak się wydaje, optymalnej selekcji badanej grupy badanie nie przyniosło pozytywnych wyników. Od czasu opublikowania doniesienia Ristowa i wsp. [16] ukazało się wiele publikacji naukowych, które dotyczyły poszukiwania mutacji Pro115Ala w licznych populacjach i grupach etnicznych [30–36], w tym także w populacji polskiej [37]. To ostatnie doniesienie dotyczyło jednak pacjentów bez cukrzycy. Negatywne wyniki tych poszukiwań mogą świadczyć o swoistości tej różnicy w sekwencji jedynie dla populacji niemieckiej. Mogło to przemawiać za tak zwanym efektem założyciela (*founder effect*). Niemniej jednak, ostatnio ogłoszone wykrycie mutacji Pro115Ala w populacji polskiej z regionu Śląska [38] może przemawiać za ograniczoną rolą tej mutacji także w naszej populacji. Niewątpliwie interesująca jest kwestia precyzyjnego określenia pochodzenia etnicznego osób z populacji śląskiej.

W podsumowaniu można stwierdzić, że mutacja Pro115Ala w genie PPAR $\gamma$  nie jest częstą przyczyną ciężkiej otyłości w populacji osób z regionu Małopolski.

## PIŚMIENNICTWO

- Chen E., Garg A.: Monogenic disorders of obesity and body fat distribution. *J. Lipid. Res.* 1999; 40: 1735–1746.
- Froguel P., Boutin P.: Genetics of Pathways Regulating Body Weight in the Development of Obesity in Humans. *Exp. Biol. Med.* 2001; 226: 991–996.
- Ravussin E., Bogardus C.: Energy balance and weight regulation: genetics versus environment. *Brit. J. Nutr.* 2000; 83, (supl. 1): S17–20.
- Esparza J., Fox C., Harper I.T. i wsp.: Daily energy expenditure in Mexican and USA Pima Indians: low physical activity as a possible cause of obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2000; 24: 55–59.
- Ravussin E., Valencia M.E., Esparza J., Bennett P.H., Schulz L.O.: Effects of a traditional lifestyle on obesity in Pima Indians. *Diabetes Care* 1994; 17: 1067–1074.
- Bouchard C.: Current understanding of the etiology of obesity genetic and nongenetic factors. *Am. J. Clin. Nutr.* 1991; 53: 1561–1565.
- Esterbauer H., Schnetler C., Oberkofler H. i wsp.: A common polymorphism in the promoter of UCP2 is associated with decreased risk of obesity in middle-aged humans. *Nat. Genet.* 2001; 28: 178–183.
- Montague C.T., Farooqi I.S., Whitehead J.P. i wsp.: Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 1997; 387: 903–908.
- Strobel A., Issad T., Camoin L., Ozata M., Strosberg A.D.: A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat. Genet.* 1998; 18: 213–215.
- Clement K., Vaisse C., Lahlou N. i wsp.: A mutation in human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 1998; 392: 398–401.
- Krude H., Biebermann H., Luck W., Horn R., Brabant G., Gruters H.: Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat. Genet.* 1998; 19: 155–157.
- Jackson R.S., Creemers J.W.M., Ohagi S. i wsp.: Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat. Genet.* 1997; 16: 303–306.
- Vaisse C., Clement K., Guy-Grand B., Froguel P.: A frame shift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat. Genet.* 1998; 20: 113–114.
- Yeo G.S.H., Farooqi I.S., Aminian S., Halsall D.J., Standhope R.C., O'Rahilly S.: A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat. Genet.* 1998; 20: 111–112.
- Hinney A., Schmidt A., Nottebohm K. i wsp.: Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999; 84: 1483–1486.
- Ristow M., Müller-Wieland D., Pfeiffer A., Krone W., Kahn R.: Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation. *N. Engl. J. Med.* 1998; 339: 953–959.
- Auwerx J.: PPAR $\gamma$ , the ultimately thrifty gene. *Diabetologia* 1999; 42: 1033–1049.
- Tontonoz P., Hu E., Spiegelman B.M.: Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR $\gamma$ 2, a lipid activated transcription factor. *Cell* 1994; 79: 1147–1156.
- Fajas L., Auboeuf D., Raspe E., Schoonjans K., Lefebvre A.M., Saladin R.: Organisation, promoter analysis and expression of the human PPAR $\gamma$  gene. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 18 779–18 789.

20. Fajas L., Fruchart J.C., Auwerx J.: PPAR $\gamma$ 3 mRNA: a distinct PPAR $\gamma$  mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Letters* 1998; 438: 55–60.
21. Deeb S., Fajas L., Nemoto M. i wsp.: A Pro12Ala substitution in PPAR $\gamma$ 2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat. Genet.* 1998; 20: 284–287.
22. Stumvoll M., Haring H.: The peroxisome proliferator — activated receptor-[gamma]2 Pro12Ala polymorphism. *Diabetes* 2002; 51: 2341–2347.
23. Barroso I., Gurnell M., Crowley V.E.F. i wsp.: Dominant negative mutations in human PPAR $\gamma$  associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 1999; 402: 880–883.
24. Report of a WHO Consultation: Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Geneva (1999).
25. Malecki M.T., Moczulski D.K., Klupa T. i wsp.: Homozygous combination of calpain 10 gene haplotypes is associated with type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Eur. J. Endocrinol.* 2002; 146: 695–699.
26. Malecki M.T., Klupa T., Wanic K., Cyganek K., Frey J., Sieradzki J.: Vitamin D binding protein gene and genetic susceptibility to type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2002; 57: 99–104.
27. Gotoda T., Scott J., Aitman T.J.: Molecular screening of the human melanocortin-4 receptor gene: identification of a missense variant showing no association with obesity, plasma glucose or insulin. *Diabetologia* 1997; 40: 976–979.
28. Rosmond R., Chagnon M., Bouchard C., Björntorp P.: A missense mutation in the human melanocortin-4 receptor gene in relation to abdominal obesity and salivary cortisol. *Diabetologia* 2001; 44: 1335–1338.
29. Blüher M., Paschke R.: PPAR $\gamma$  polymorphisms in obese patients with impaired glucose tolerance. Doniesienie zjazdowe XVII Międzynarodowego Sympozjum Cukrzycowego w Karlsruhe, 2000.
30. Hamann A., Münzberg H., Buttrón P. i wsp.: Missense variants in the human peroxisome proliferator — activated receptor — gamma 2 gene in lean and obese subjects. *Eur. J. Endocrinol.* 1999; 141: 90–92.
31. Ek J., Urhammer S.A., Sørensen T.I., Andersen T., Auwerx J., Pedersen O.: Homozygosity of the Pro12Ala variant of the peroxisome proliferation-activated receptor- $\gamma$ 2 (PPAR- $\gamma$ 2): divergent modulating effects on body mass index in obese and lean Caucasian men. *Diabetologia* 1999; 42: 892–895.
32. Clement K., Hereberg S., Passinge B. i wsp.: The Pro115Gln and Pro12Ala PPAR $\gamma$  gene mutations in obesity and type 2 diabetes. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2000; 24: 391–393.
33. Shuldiner A.R., Nguyen W., Kao W.H. i wsp.: Pro115Gln peroxisome proliferator — activated receptor- $\gamma$  and obesity. *Diabetes Care* 2000; 23: 126–127.
34. Lei H.H., Chen M.H., Yang W.S. i wsp.: Peroxisome proliferator — activated receptor- $\gamma$ 2 Pro12Ala gene variant is strongly associated with larger body mass in the Taiwanese. *Metabolism* 2000; 49: 1267–1270.
35. Schaffler A., Barth N., Schmitz G., Zietz B., Palitzsch K.D., Scholmerich J.: Frequency and significance of Pro12Ala and Pro115Gln polymorphism in gene for peroxisome proliferation — activated receptor- $\gamma$  regarding metabolic parameters in Caucasian cohort. *Endocrine* 2001; 14: 369–373.
36. Blüher M., Klemm T., Gerike T., Krankenberg H., Schuler G., Paschke R.: Lack of association between peroxisome proliferator — activated receptor- $\gamma$ 2 gene variants and the occurrence of coronary heart disease in patients with diabetes mellitus. *Eur. J. Endocrinol.* 2002; 146: 545–551.
37. Dembińska-Kieć A., Malczewska-Malec M., Wybrańska I., Boddzioch M.: Badania nad genetycznym podłożem otyłości w rodzinach Polski Południowej. *Medycyna Metaboliczna* 2002; 6, supl.: W7.
38. Milewicz A., Bidzińska B., Demissie M., Tworowska U.: Aspekty endokrynologiczne otyłości. *Medycyna Metaboliczna* 2002; 6, supl.: W18.