



ISSN: 0067-2904
GIF: 0.851

دراسة التغيرات الجينية لجين *GCG* وعلاقتها بمرض البدانة في المجتمع العراقي

مصطفى نهاد جمعة الدراجي^{١*}، ناهي يوسف ياسين^٢، عادل فوزي شهاب^٣، هند حسين عبيد^٤

^١ قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الانبار، الانبار، العراق

^٢ المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية، الجامعة المستنصرية، بغداد، العراق

^٣ قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة تكريت، صلاح الدين، العراق

^٤ قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة بغداد، بغداد، العراق

الخلاصة

اجريت الدراسة على 120 فرد من الذكور المصابين بالبدانة و 50 فرد من الذكور الاصحاء، تراوحت اعمارهم من 20-50 سنة، تم تقسيم المصابين الى ثلاثة مجاميع اعتماداً على مؤشر كتلة الجسم BMI والبدانة المركزية CO. اذ لوحظ وجود علاقة ارتباط معنوية بين كلا المؤشرين. تم عزل الـ DNA من دم المصابين واجري تفاعل PCR باستخدام البودائ الخاصة لمنطقتي التشفير الاولى والثالثة لجين *GCG*. اظهرت النتائج وجود طفرات في منطقة التشفير الاولى بالموقع 9573 (G/C) في 30 عينة مصابة بالبدانة والموقع 9864 (C/-) في 10 عينات مصابة بالبدانة وبقيمة مربع كاي 12.30. وفي الموقع 5397 (A/G) في 28 عينة مصابة بالبدانة، والموقع 5434 (G/A) في 8 عينات مصابة بالبدانة لمنطقة التشفير الثالثة وبقيمة مربع كاي 11.11. وهذه الطفرات كانت ذات تاثير معنوي عالي $P \leq 0.001$ في احداث المرض.

الكلمات المفتاحية: جين *GCG*، البدانة، glucagon، GLP-1، GLP-2.

The Study of Genetic Variations of *GCG* Gene and it's Relationship to Obese in Iraqi Population

Mustafa N. J. Al-Darrji^{1*}, Nahi Y. Yaseen², Adil F. Shehab³, Hind H. Obaid⁴

¹Department of Biology, College of Science, Al-Anbar University, Al-Anbar, Iraq

²Iraqi Center for Cancer and Medical Genetic Research, Al-Mustansiryia University, Baghdad, Iraq

³Department of Biology, College of Science, Tikrit University, Salah ad Din, Iraq

⁴Department of Biology, College of Science, University of Baghdad, Baghdad, Iraq

Abstract

The present study conducted on 120 obese males and 50 healthy males, their age ranged from 20-50 years. The patients were divided into 3 groups based on Body Mass Index (BMI) and Central Obesity (CO), it has noticed that there is a significant relation between both indexes. The DNA was isolated from the blood of patients and applies for PCR by using designed primers for exons 1 and 3 of *GCG* gene. The results showed that there are mutants in exon 1 at locus 9573 (G/C) for 30 patients and locus 9864 (C/-) for 10 patients with $X^2 = 12.30$, also it has fund mutants in exon 3 at locus 5397 (A/G) for 28 patients and locus 5434 (G/A) for 8 patients with $X^2 = 11.11$. These mutants have a high significant effect $P \leq 0.001$ to cause pathogenicity.

Keywords: *GCG* gene, Obesity, glucagon, genetic variations.

المقدمة

البدانة من الامراض المعقدة التي تحدث بفعل تداخل عوامل وراثية وبيئية ، كما أظهرت العديد من الدراسات بان الاستعداد الوراثي للإصابة بالبدانة تختلف باختلاف العرق [2,1] .

يتداول العديد من افراد المجتمعات في معظم دول العالم عدد من المصطلحات للدلالة على ظاهرة التراكم الحيوي في الجسم مثل البدانة obesity ، السمنة chubby أو puffy أو fleshy و فرط الوزن overweight رغم ان هذه المفردات تتباين علمياً في وصف هذه الظاهرة [4,3] . كذلك فان هذه الظاهرة لا تقتصر على المجتمع البشري فحسب بل يمكن ملاحظتها في المجتمعات الحيوانية المختلفة [6,5] .

لقد شهدت ظاهرة البدانة اهتماماً علمياً واسعاً مع نهايات القرن الماضي و العقد الاول من القرن الحالي و كان من أهم هذه الدراسات تلك التي تناولت العلاقة الوراثية بهذه الظاهرة و تشخيص العامل الوراثي (الجين) و الخارطة الوراثية [7-9] ، من خلال عينات بشرية متنوعة كالأطفال [10-12] ، و النساء [14,13] ، وبالبالغين [15-17] .

وفقاً الى تقرير منظمة الصحة العالمية WHO فإن البدانة قد بلغت حد الوبائية العالمية . في الغالب فإن 2.6 مليون شخص يموت سنوياً بسبب البدانة او زيادة الوزن . وفي دراسة لمنظمة الصحة العالمية 2008 أظهرت ان من بين كل عشرة اشخاص هناك اكثر من شخص واحد مصابين بالبدانة أي ما يقارب 1.5 بليون من مجموع البالغين في العالم وقد افترضت المنظمة ان عدد المصابين بزيادة الوزن سيبلغ تقريبا 2-3 بليون بحلول عام 2015 وعدد المصابين بالبدانة سيبلغ اكثر من 700 بليون [18] .

في آسيا أزدادت معدلات زيادة الوزن والبدانة بشكل مثير و بدرجات متفاوتة بين البلدان المختلفة ، أذ كانت اقل في فيتنام وإندونيسيا منه في اليابان وسنغافورة وماليزيا وهونكوك [19] . اما في العراق فقد اختلفت النسبة تبعاً لمكان الدراسة حيث ان الدراسات التي تمت على عينات تقطن الريف اوضحت وجود نسبة اعلى من البدانة من غيرها ويظهر ذلك من اختلاف نسب البدانة بين المحافظات والمركز . فقد اظهرت دراسة [20] ان نسبة البدانة في العراق للرجال والنساء هي 8% و 19% تبعاً . وفي دراسة اجريت في البصرة اظهرت نسبة البدانة (بحسب مؤشر كتلة الجسم) ما يقارب الـ 37% لمجموع الجنسين [21] .

يشير تقرير منظمة التعاون الاقتصادي و التنمية (Organization of Economic Co-operation and Development) الى معدلات بدانة تتراوح من 4% في اليابان الى 30% أو اكثر في الولايات المتحدة الامريكية والمكسيك [22] ، وان مرض البدانة يكلف 1-3% من الرعاية الصحية في معظم دول العالم و من 5-10% في الولايات المتحدة وهذه النفقات تزيد حوالي 25% من الرعاية الصحية للفرد السليم . وبالإستناد الى الإحصائيات العالمية المستمرة المعنية بالصحة العامة فإن العدد الهائل للأفراد الذين يعانون من البدانة (أو ما يصطلح عليها بالسمنة) أصبح يشير بوضوح الى أن البدانة أصبحت من أمراض العصر الشائعة و واسعة الإنتشار في العالم و التي تتطلب التدخل للحد منها أو التقليل من مستوياتها من خلال نشر الوعي الصحي ، والدراسات المعنية بالوقوف على المسببات الدقيقة و كيفية الحد منها ، و تسابق المختبرات العلمية الدوائية العالمية من أجل إنتاج العقاقير التي من شأنها علاج هذه الحالة ، والتدخلات الجراحية الطبية و التجميلية التي تهدف الى إستباق أو علاج التدهور الصحي أو المظهري الذي تتسبب به [23] .

الجين glucagon

يقع جين Glucagon (GCG) على كروموسوم 2 وبالتحديد في الموقع 2q24.2 ويشفر هذا الجين لبروتين Preproglucagon [24] . يتركب بروتين Preproglucagon (نتاج الجين) من 180 حامض اميني وهو شديد التشابه مع نظيره في الانواع الاخرى من اللبائن (اكثر من 90% تماثل في تسلسل الاحماض الامينية) [25] .

يتحرر Preproglucagon من قبل خلايا الفا في البنكرياس ، بينما يتحرر في الامعاء وبالتحديد في اللفانفي والقولون من قبل خلايا L cells ، اذ ينتجراً Preproglucagon في الدماغ والامعاء الى متعدد الببتيدات (Glicentin-، Glicentin) (GRPP) ، Oxyntomodulin ، related pancreatic polypeptide (OXY or OXM) ، Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) ، Glucagon-like peptide 2 (GLP-2) ، بينما يتجزأ في البنكرياس الى متعدد الببتيدات (Glucagon) ، GRPP ، major proglucagon fragment (MPGF) [26-27] .

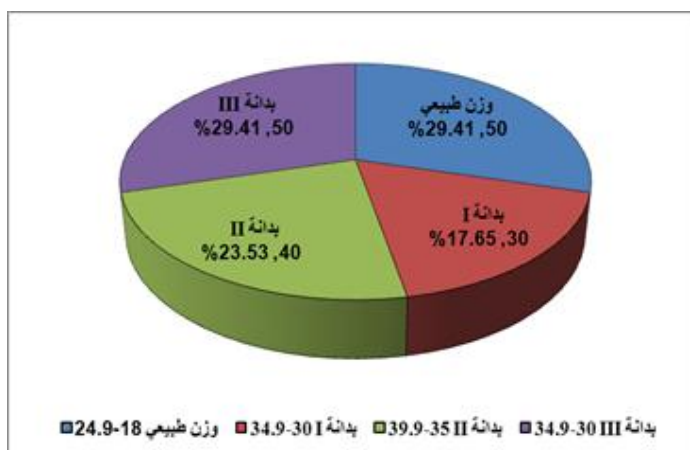
يعمل الكلوكاكون على رفع تركيز سكر الدم وبذلك يكون عمله معاكس للانسولين الذي يقلل من سكر الدم ، اذ يحث الكبد على تحويل الكلايوكوجين المخزون الى كلوكوز عندما تنخفض مستويات كلوكوز الدم لذلك فهو يشترك مع الانسولين في تنظيم كلوكوز الدم

من خلال عملية feedback system [28]. ويحث الكلوكاكون على عملية تحليل الدهون lipolysis تحت ظروف كبت الانسولين كما في المصابين بالسكري نوع 1 [29]. بينما يمتلك GLP-1 و GLP-2 وظيفة فسيولوجية واضحة ولهم مستقبلاتهما الخاصة فان الوظيفة الفسيولوجية لبقيّة المشتقات البوليببتيدية غير واضحة [27]. حيث بينت دراسة [30] تأثير GLP-1 احد نواتج جين GCG كمؤشر للشباع وانخفاض مستواه يؤدي الى التخمة والبدانة ، واوضحت دراسة [31] دور جين GCG في ارسال اشارات مؤثرة في الشعور بالشباع وكمية الغذاء المتناول والتي تؤثر لاحقاً في شكل ووزن الجسم . كما اظهرت الدراسات ان جين GCG له تأثير مهم في تنظيم عمل المعدة والامعاء ويحفز تحرير الانسولين والاستجابة الى تناول الطعام [32-33]. كما يلعب GLP-2 هو الاخر دوراً في البدانة اذ يعمل على تنظيم امتصاص الطعام حيث ان حقن جرع من GLP-2 داخل مخ الجرذان نتج عنه تثبيط امتصاص الغذاء [34] ، في حين ادى حقن الفئران بجرع من GLP-2 تحت الجلد الى تثبيط الحاجز الطلائي في الامعاء ويعمل الاخير على تقليل تدفق الدهون متعددة السكريات Lipopolysaccharides من تجويف الامعاء الى داخل جهاز الدوران [35-36]. اظهرت دراسة [37] استخدام فيها فئران مصابة بالسكري من النوع الثاني وحقنت بالانسولين مع تعزيز تعبير انزيم GLP-1 لوحظ انخفاض وزن الجسم بعد 14 يوماً من الحقن وظهور دور ارتفاع تعبير GLP-1 في إفراز خلايا L المعوية ويحتمل أن تنطوي على تفعيل الأنسولين [37]. وبينت دراسة [38] دور GLP-1 في تحفيز افراز الانسولين من خلال عمل الانترلوكين ٦ على تفعيل Interleukin-6 الذي يعمل على زيادة قيمة GLP-1 في الفئران المصابة بالسكري من النوع الثاني . ولوحظ ان ارتفاع قيمة GLP-1 باستخدام بعض المرافقات العلاجية يؤدي الى خفض كمية الكلوكوز بالاضافة الى زيادة الانسولين وتحسن كبير في تحمل الكلوكوز والحساسية للانسولين في الفئران العادية والبدانة [39]. وقد اظهرت الدراسات الصيدلانية ان اعطاء الانسان جرع من الكلوكاكون يساهم في خفض حركة الامعاء الدقيقة وكذلك الغليظة [40-41]. وبينت دراسة [42] ان اعطاء جرع من GLP-1 والكلوكاكون ادى الى زيادة استهلاك الطاقة وهذا الالية ربما تمثل علاج ناجح لمرضى البدانة السكري من النوع الثاني . كما اشارت دراسة [43] ان الكلوكاكون في الانسان يعمل على تنظيم اللايبوبروتين الكبدى من خلال خفض انتاج جزيئات اللايبوبروتين وتثبيط عمل الدقائق المنظفة Clearance particle في حين وجد ان ليس له أي تأثير على ابيض اللايبوبروتين في الامعاء . وفي عام ٢٠١٣ اثبتت الدراسة ان الكوكاكون يسيطر على ابيض الدهون والطاقة والكلوكوز من خلال مسار معتمد على هرمون النمو fibroblast growth factor 21 (FGF21) [44].

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

جمع العينة

جمعت عينات الدم من 170 شخص من الذكور فقط تراوحت اعمارهم من 20 - 50 سنة ، 120 منهم كانوا مصابين بالبدانة تم تقسيمهم اعتماداً مؤشر كتلة الجسم BMI الى مجموعة البدانة I (BMI= 30-34.9) و مجموعة البدانة II (BMI= 35-39.9) و مجموعة البدانة III (40 فما فوق BMI) اما بقية الاشخاص تم اعتمادهم كمجموعة سيطرة (الاصحاء ، BMI= 18-24.9) ، كما في والشكل ١- . وضعت عينات الدم في انبوية حاوية على EDTA بحجم 4 مل وتم حفظها بدرجة حرارة - 20 م° لحين اجراء التجارب المطلوبة .



الشكل ١- توزيع عينة المصابين بالبدانة الى مجاميع اعتماداً على BMI

Body Measurements القياسات الجسمية

تتضمن قياس الوزن والطول لكل شخص لغرض استخراج قيم مؤشر كتلة الجسم (BMI) Body Mass Index والناتج من قسمة الوزن على مربع الطول (كغم/م^٢) ، وقياس محيط الخصر Waist circumference الى محيط الورك Hip circumference او ما يعرف Waist Hip Ratio (WHR) للتعرف من خلالها على مقدار البدانة المركزية (CO.) Central Obesity .

DNA استخلاص الـ

تم استخلاص الـ DNA من عينة الدم حسب تعليمات العدة (Kit) المجهز من شركة Geneaid الكورية بالاعتماد على بروتوكول استخلاص الـ DNA المجهز من قبل الشركة .

تشخيص جين GCG باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

تم تضخيم منطقة التشفير الاولى والتي كانت بحجم 310 bp باستخدام بادئ امامي (-5) (AGCCACGTGGGATGTTTGA-3) وبداي خلفي (3-CACCACTGTGGCTACCAGTTC-5) ومنطقة التشفير الثالثة والتي كانت بحجم 147 bp باستخدام بادئ امامي (-3) (5-ATCATTACAGCTTCCCAGG) وبداي خلفي (-5) (TTCATCAACCACTGCACAAAA-3) . جهزت البوادئ جميعها من شركة Integrated DNA Technologies الامريكية . تم استخدام 25 مايكروليتر كحجم نهائي لاختبار الـ PCR يحتوي على 2 مايكروليتر من الـ DNA بتركيز 100ng/μL، اذ تم حساب تركيز ونقاوة الـ DNA باستخدام جهاز النانودروب (Nano drop)، و 12.5 μL من Go-Tag® Green Master Max (Taq DNA polymerase) 2X ، dNTPs ، reaction buffers at optimal concentration ، MgCl₂ and (promega USA) ، وتم اكمال الحجم بإضافة الماء الخالي من النيوكليز nucleases free water .

ان برنامج جهاز الدوران الحراري Thermal cycling لتفاعل الـ PCR الذي استخدم لتضخيم منطقة التشفير الاولى كان كالآتي: مرحلة المسخ Denaturation استخدمت درجة حرارة 94 °م لمدة 5 دقائق يليها 35 دورة وكل دورة تتضمن مسخ Denaturation بدرجة حرارة 94 °م لمدة 45 ثانية ثم التهام annealing بدرجة حرارة 62 °م لمدة 53 ثانية ثم استطالة extension بدرجة حرارة 72 °م لمدة 45 ثانية ، واخيراً مرحلة الاستطالة النهائية final extension بدرجة حرارة 72 °م لمدة 10 دقائق . اما بالنسبة لتضخيم منطقة التشفير الثالثة كان البرنامج كالآتي: مرحلة المسخ Denaturation استخدمت درجة حرارة 94 °م لمدة 5 دقائق يليها 30 دورة وكل دورة تتضمن مسخ Denaturation بدرجة حرارة 94 °م لمدة 45 ثانية ثم التهام annealing بدرجة حرارة 60 °م لمدة 35 ثانية ثم استطالة extension بدرجة حرارة 72 °م لمدة 45 ثانية ، واخيراً مرحلة الاستطالة النهائية final extension بدرجة حرارة 72 °م لمدة 10 دقائق .

تم ترحيل نواتج تفاعل الـ PCR على هلام الاكاروز بتركز 1.5% (100 فولت/سم وتيار 40 ملي امبير ولمدة ساعة ونصف) وتم تعريض الهلام الى الاشعة فوق البنفسجية (302 نانوميتر) من اجل رؤية حزم الهلام بعد تصبغه بصبغة الاثيديوم بروميد . ethidium bromide .

Sequences تتابع النيوكليوتيدات

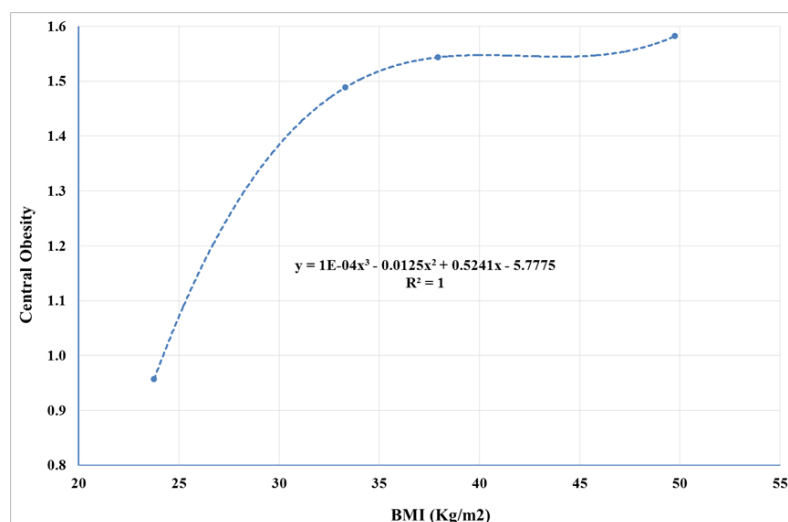
تم ارسال نتائج تفاعل البلمرة وبحجم 20 مايكروليتر الى شركة Macro gen الامريكية وبعد الحصول على النتائج تم استخدام برنامج Blast في الموقع الالكتروني العالمي لبنك الجينات NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) وبرنامج المعلوماتية BioEdit وباستخدام برنامج Expasy لترجمة الشفرات الوراثية للتتابعات الى احماض امينية .

Statistical Analysis التحليل الاحصائي

تم اختبار معنوية الفروق بين قيم البيانات قيد الدراسة باستخدام مربع كاي (Chi-square Test) (X^2) تحت مستوى معنوية $P \leq 0.001$.

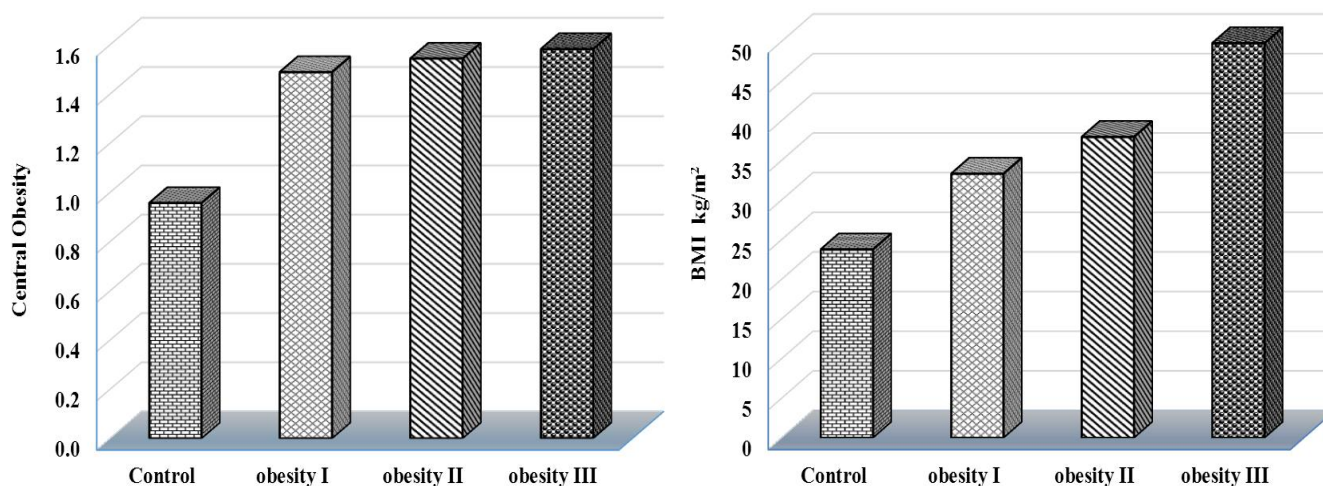
Results and Discussion النتائج والمناقشة**Body Mass Index and Central Obesity مؤشر كتلة الجسم والبدانة المركزية**

اظهرت النتائج الشكل-٢ وجود علاقة ارتباط معنوية بين مؤشر كتلة الجسم والبدانة المركزية ، اذ ترتفع قيمة البدانة المركزية بارتفاع قيمة مؤشر كتلة الجسم .



الشكل ٢- العلاقة بين مؤشر كتلة الجسم BMI والبدانة المركزية CO.

بينت نتائج الشكل-٣ والجدول-١ وجود اختلاف في قيم مؤشر كتلة الجسم بين مجاميع البدانة الثلاثة ، في حين لم يلاحظ وجود اختلاف في قيم البدانة المركزية بين مجاميع البدانة الثلاثة .



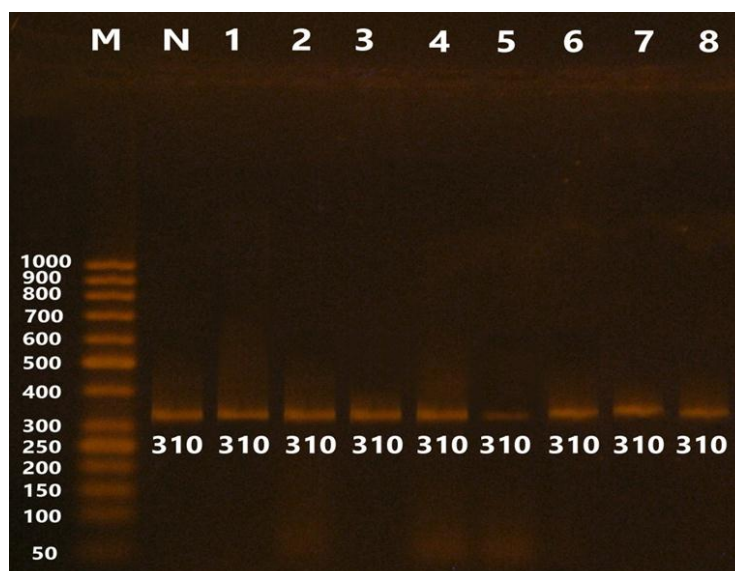
الشكل ٣- مؤشر كتلة الجسم BMI والبدانة المركزية CO. للمصابين بالبدانة لمجاميع البدانة والسيطرة

جدول ١- توزيع العينة الى مجموعات اعتماداً على معدل كتلة الجسم والبدانة المركزية

CO.	BMI	عدد العينات	قيمة الفئة الوزنية	الوزن
0.96	23.76	50	24.9-18	مجموعة الوزن الطبيعي
1.49	33.31	30	34.9-30	مجموعة البدانة I
1.54	37.95	40	39.9-35	مجموعة البدانة II
1.58	49.76	50	40- فما فوق	مجموعة البدانة III

منطقة التشفير الاولى لجين *GCG* (*GCG gene exon 1*)

اظهر ترحيل ناتج تفاعل الـ PCR على هلام الاكاروز الحصول على منطقة التشفير الاولى لجين *GCG* لعينة الدراسة والتي كانت بحجم 310 bp كما موضح في الشكل-٤ .



الشكل ٤- نوضع ترحيل ناتج تضخيم منطقة التشفير الاولى لجين *GCG* (*GCG* gene exon 1) على هلام الأكاروز المحضر بتركيز 1.5% (100 فولت/سم وتيار 40 ملي أمبير ولمدة ساعة ونصف) ، ويتدرج المعلم القياسي بحجم 50 bp وبممرات N اصحاء و 1-8 للمرضى.

كما اظهرت النتائج بعد اجراء المقارنة مع بنك المعلومات وحسب الموقع www.ncbi.nlm.nih.gov . ان جميع نتائج الاصحاء كانت متطابقة مع بنك المعلومات كما في الشكل-٥ .

Human glucagon gene			
Sequence ID: emb X03991.1 Length: 10050 Number of Matches: 1			
Range 1: 9570 to 9863 GenBankGraphics Next Match Previous Match First Match			
Score : 544 bits(294) Expect : 3e-151 Identities : 294/294(100%) Gaps : 0/294(0%)			
Strand : Plus/Plus			
Query	11	AGAGGTGTATTTCTGAGGCCACATTGCTTTGCATGCCAATAAATAAATTTTCTTTTAGTGT	70
Sbjct	9570	AGAGGTGTATTTCTGAGGCCACATTGCTTTGCATGCCAATAAATAAATTTTCTTTTAGTGT	9629
Query	71	TGTGTAGCCAAAAATTACAAATGGAATAAAGTTTTATCAAAATATTGCTAAAAATATCAGC	130
Sbjct	9630	TGTGTAGCCAAAAATTACAAATGGAATAAAGTTTTATCAAAATATTGCTAAAAATATCAGC	9689
Query	131	TTTTAAATATGAAAGTGCTAGATTCTGTTATTTTCTTCTTATTTTGGATGAAGTACCCCA	190
Sbjct	9690	TTTTAAATATGAAAGTGCTAGATTCTGTTATTTTCTTCTTATTTTGGATGAAGTACCCCA	9749
Query	191	ACCTGTTTACATTTAGCGATAAAATTATTTTCTATGATATAAATTTGTAATGTAATTA	250
Sbjct	9750	ACCTGTTTACATTTAGCGATAAAATTATTTTCTATGATATAAATTTGTAATGTAATTA	9809
Query	251	TTCCGATCTGACATATCTGCATTATAATAATAGGAGAATAGAAGAACTGGTAGC	304
Sbjct	9810	TTCCGATCTGACATATCTGCATTATAATAATAGGAGAATAGAAGAACTGGTAGC	9863

الشكل ٥- يوضح التسلسل الجزيئي الموازي للشريط الحساس لقطعة التشفير الاولى لجين *GCG* لـ 20 عينة من الاصحاء ، مقارنة مع جين *GCG* القياسي الذي تم الحصول عليه من بنك الجينات ، تتابع الشطية Query تمثل العينة ، تتابع المقارن sbjct تمثل قاعدة بيانات المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI) National Center Biotechnology Information

في حين بينت نتائج عينات المصابين بالبدانة وجود تباين في منطقتين الاولى وجود تباين بالمنطقة رقم 9573 حيث تغيرت القاعدة الكوانين G الى السايروسين C من النوع الانقلابي Transeversion والذي يؤدي الى تغير الحامض الاميني من كلايسين Glycine الى ارجنين Arginine كما موضح في الشكل-٦ أ ، اما الثانية فكانت بحذف قاعدة في المنطقة 9864 حيث فقدت القاعدة السايروسين C مما ادى الى تباين في قراءة الشفرات على امتداد الشريط المستسخ كما موضح في الشكل-٦ ب ، لذلك اظهرت نتائج الاحصاء باستخدام مربع كاي Chi-square ان الطفرتين كانتا ذات تأثير معنوي في احداث المرض وبقيمة 12.30 وتحت مستوى معنوية عالي $p \leq 0.001$ بالمقارنة مع مجموعة السيطرة . كما في الجدول-٢ .

جدول ٢- مكان التغير النيوكليوتيدي في رقم التشفير للحامض الاميني وتأثير الطفرة ونوعها لمرضى المصابين بالبدانة منطقة التشفير الاولى جين

GCG

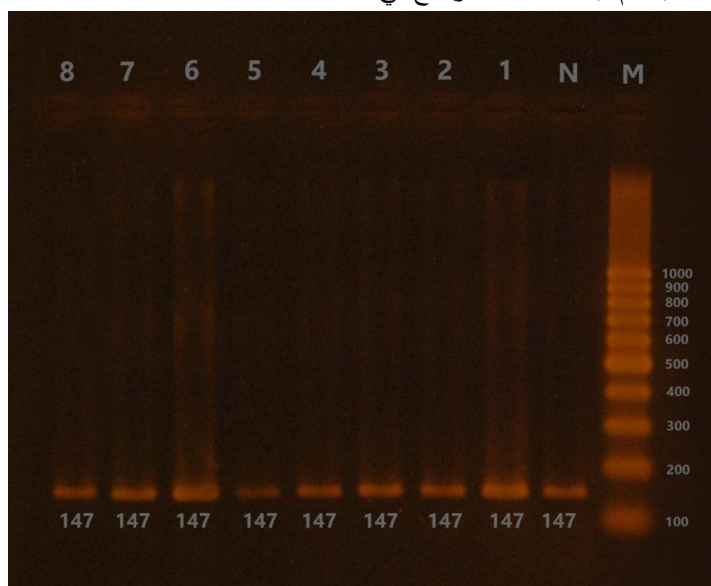
Replication of Mutation	location of gene bank	Nucleotide change	Amino acid change	Predicted effect	Type of mutation
33	G9573C	GGT/CGT	Glycine/Arginine	Missense	Transversion
10	C9864 -	CAC/-AC	Framshift	Deletion	Framshift

Human glucagon gene				(١٦)
Sequence ID: emb X03991.1 Length: 10050 Number of Matches: 1				
Range 1: 9570 to 9874 GenBankGraphics Next Match Previous Match				
Score : 538 bits(291)		Expect : 1e-149		Identities : 293/294(99%)
Strand : Plus/Plus		Gaps : 0/294(0%)		
Query	10	AGACGTGTATTCTGAGGCCACATTGCTTTGCATGCCAATAAATAAATTTTCTTTTAGTGT	69	
Sbjct	9570	AGACGTGTATTCTGAGGCCACATTGCTTTGCATGCCAATAAATAAATTTTCTTTTAGTGT	9629	
Query	70	TGTGTAGCCAAAAATTACAAATGGAATAAAGTTTATCAAAATATTGCTAAAAATATCAGC	129	
Sbjct	9630	TGTGTAGCCAAAAATTACAAATGGAATAAAGTTTATCAAAATATTGCTAAAAATATCAGC	9689	
Query	130	TTTAAATATGAAAGTGCTAGATTCTGTTATTTCTTCTTATTTGGATGAAGTACCCCA	189	
Sbjct	9690	TTTAAATATGAAAGTGCTAGATTCTGTTATTTCTTCTTATTTGGATGAAGTACCCCA	9749	
Query	190	ACCTGTTTACATTTAGCGATAAAAATTATTTTCTATGATATAAATTTGTAATGTAATTA	249	
Sbjct	9750	ACCTGTTTACATTTAGCGATAAAAATTATTTTCTATGATATAAATTTGTAATGTAATTA	9809	
Query	250	TTCCGATCTGACATATCTGCATTATAATAATAGGAGAATAGAAGAAGTGGTAGCCACAGT	308	
Sbjct	9810	TTCCGATCTGACATATCTGCATTATAATAATAGGAGAATAGAAGAAGTGGTAGCCACAGT	9869	
Query	309	GGTGA 313		
Sbjct	9870	GGTGA 9874		
Human glucagon gene				(١٦)
Sequence ID: emb X03991.1 Length: 10050 Number of Matches: 1				
Range 1: 9570 to 9874 GenBankGraphics Next Match Previous Match				
Score : 551 bits(298)		Expect : 2e-153		Identities : 303/305(99%)
Strand : Plus/Plus		Gaps : 1/305(0%)		
Query	10	AGACGTGTATTCTGAGGCCACATTGCTTTGCATGCCAATAAATAAATTTTCTTTTAGTGT	69	
Sbjct	9570	AGACGTGTATTCTGAGGCCACATTGCTTTGCATGCCAATAAATAAATTTTCTTTTAGTGT	9629	
Query	70	TGTGTAGCCAAAAATTACAAATGGAATAAAGTTTATCAAAATATTGCTAAAAATATCAGC	129	
Sbjct	9630	TGTGTAGCCAAAAATTACAAATGGAATAAAGTTTATCAAAATATTGCTAAAAATATCAGC	9689	
Query	130	TTTAAATATGAAAGTGCTAGATTCTGTTATTTCTTCTTATTTGGATGAAGTACCCCA	189	
Sbjct	9690	TTTAAATATGAAAGTGCTAGATTCTGTTATTTCTTCTTATTTGGATGAAGTACCCCA	9749	
Query	190	ACCTGTTTACATTTAGCGATAAAAATTATTTTCTATGATATAAATTTGTAATGTAATTA	249	
Sbjct	9750	ACCTGTTTACATTTAGCGATAAAAATTATTTTCTATGATATAAATTTGTAATGTAATTA	9809	
Query	250	TTCCGATCTGACATATCTGCATTATAATAATAGGAGAATAGAAGAAGTGGTAGC-ACAGT	308	
Sbjct	9810	TTCCGATCTGACATATCTGCATTATAATAATAGGAGAATAGAAGAAGTGGTAGCCACAGT	9869	
Query	309	GGTGA 313		
Sbjct	9870	GGTGA 9874		

الشكل ٦- يوضح التسلسل الجزيئي الموازي للشريط الحساس لمنطقة التشفير الاولى 1 exon لجين GCG لـ 40 عينة من المصابين بالبدانة . حيث يمثل أ- التسلسل الجزيئي لـ (30) عينة و ب- التسلسل الجزيئي لـ (10) عينات مقارنة مع جين GCG القياسي الذي تم الحصول عليه من بنك الجينات ، حيث تتابع الشظية Query تمثل العينة ، و التابع المقارن subject تمثل قاعدة بيانات المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI) National Center Biotechnology Information

منطقة التشفير الثالثة لجين *GCG* (*GCG* gene exon 3)

اظهر ترحيل ناتج تفاعل الـ PCR على هلام الاكاروز الحصول على منطقة التشفير الثالثة لجين *GCG* لعينة الدراسة والتي كانت بحجم 147 bp كما موضح في الشكل-٧ .



الشكل ٧- توضع ترحيل ناتج تضخيم منطقة التشفير الثالثة لجين *GCG* (*GCG* gene exon 3) على هلام الأكاروز المحضر بتركيز 1.5% (100 فولت/سم و تيار 40 ملي أمبير ولمدة ساعة ونصف) ، ويتدرج المعلم القياسي بحجم M:100 bp ويممرات N اصحاء و 1-8 للمرضى .

واظهرت النتائج بعد اجراء المقارنة مع بنك المعلومات وحسب الموقع www.ncbi.nlm.nih.gov . ان جميع نتائج الاصحاء كانت متطابقة مع بنك المعلومات كما في الشكل-٨ .

Human glucagon gene				
Sequence ID: embX03991.1 Length: 10050 Number of Matches: 1				
Range 1: 5339 to 5500 GenBankGraphics Next Match Previous Match				
Score : 300 bits(162)		Expect : 3e-78	Identities : 162/162(100%)	Gaps : 0/162(0%)
Strand : Plus/Plus				
Query	1	ATCATTCTCAGCTTCCCAGGCAGACCCACTCAGTGATCCTGATCAGATGAACGAGGACAA	60	
Sbjct	5339	ATCATTCTCAGCTTCCCAGGCAGACCCACTCAGTGATCCTGATCAGATGAACGAGGACAA	5398	
Query	61	GCGCCATTACAGGGCACATTCACCAGTGACTACAGCAAGTATCTGGACTCCAGGCGTGC	120	
Sbjct	5399	GCGCCATTACAGGGCACATTCACCAGTGACTACAGCAAGTATCTGGACTCCAGGCGTGC	5458	
Query	121	CCAAGATTTGTGCAGTGGTTGATGAA	147	
Sbjct	5459	CCAAGATTTGTGCAGTGGTTGATGAA	5500	

الشكل ٨- يوضح التسلسل الجزيئي الموازي للشريط الحساس لقطعة التشفير الثالثة لجين *GCG* لـ 20 عينة من الاصحاء ، مقارنة مع جين *GCG* القياسي الذي تم الحصول عليه من بنك الجينات ، تتابع الشطية Query تمثل العينة ، تتابع المقارن sbjct تمثل قاعدة بيانات المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI) National Center Biotechnology Information

اظهرت النتائج وجود تغاير في منطقتين الاولى كانت في المنطقة رقم 5397 حيث تغيرت القاعدة الالدينين A الى الكوانين G من النوع الانتقالي Transition والذي يؤدي الى تغير الحامض الاميني من اللايسين Lysine الى ارجنين Arginine كما في الشكل-٩ ، اما الثانية فكانت في المنطقة 5434 ادى الى تغاير مغلط انتقلت فيه القاعدة الكوانين G الى الالدينين A مما ادى انعكس سلباً في تغاير التشفير للحامض الاميني من السيرين Serine الى الاسبراجين Asparagine كما في الشكل-٩ب، ان وجود هذه الطفرات ادى الى ظهور تأثير معنوي عالي في احداث الامراضية وبقيمة مربع كاي 11.11 وتحت مستوى معنوية عالي $p \leq 0.001$ بالمقارنة مع مجموعة السيطرة، كما في الجدول-٣ .

جدول ٣- مكان التغير النيوكليوتيدي في رقم التشفير للحامض الاميني وتأثير الطفرة ونوعها لمرضى المصابين بالبدانة منطقة التشفير الثالثة جين *GCG*

Replication of Mutation	location of gene bank	Nucleotide change	Amino acid change	Predicted effect	Type of mutation
28	A5397G	AAG/AGG	Lysine/Arginine	Missense	Transition
8	G5434A	AGC/AAC	Serine/Asparagine	Missense	Transition

(أ)					
Human glucagon gene					
Sequence ID: emb X03991.1 Length: 10050 Number of Matches: 1					
Range 1: 5339 to 5485 GenBankGraphics Next Match Previous Match					
Score : 267 bits(144) Expect : 3e-68 Identities : 146/147(99%) Gaps : 0/147(0%)					
Strand : Plus/Plus					
Query	1	ATCATTTCTCAGCTTCCCAGGCAGACCCACTCAGTGATCCTGATCAGATGAACGAGGACGA	60		
Sbjct	5339	ATCATTTCTCAGCTTCCCAGGCAGACCCACTCAGTGATCCTGATCAGATGAACGAGGACAA	5398		
Query	61	GCGCCATTCACAGGGCACATTCACCAGTGACTACAGCAAGTATCTGGACTCCAGGCGTGC	120		
Sbjct	5399	GCGCCATTCACAGGGCACATTCACCAGTGACTACAGCAAGTATCTGGACTCCAGGCGTGC	5458		
Query	121	CCAAGATTTTGTGCAGTGGTTGATGAA	147		
Sbjct	5459	CCAAGATTTTGTGCAGTGGTTGATGAA	5485		
(ب)					
Human glucagon gene					
Sequence ID: emb X03991.1 Length: 10050 Number of Matches: 1					
Range 1: 5339 to 5485 GenBankGraphics Next Match Previous Match					
Score : 267 bits(244) Expect : 2e-149 Identities : 146/147(95%) Gaps : 0/147(0%)					
Strand : Plus/Plus					
Query	1	ATCATTTCTCAGCTTCCCAGGCAGACCCACTCAGTGATCCTGATCAGATGAACGAGGACAA	60		
Sbjct	5339	ATCATTTCTCAGCTTCCCAGGCAGACCCACTCAGTGATCCTGATCAGATGAACGAGGACAA	5398		
Query	61	GCGCCATTCACAGGGCACATTCACCAGTGACTACACAAGTATCTGGACTCCAGGCGTGC	120		
Sbjct	5399	GCGCCATTCACAGGGCACATTCACCAGTGACTACAGCAAGTATCTGGACTCCAGGCGTGC	5458		
Query	121	CCAAGATTTTGTGCAGTGGTTGATGAA	147		
Sbjct	5459	CCAAGATTTTGTGCAGTGGTTGATGAA	5485		

الشكل ٩- يوضح التسلسل الجزيئي الموازي للشريط الحساس لمنطقة التشفير الثالثة exon 3 لجين *GCG* لـ 40 عينة من المصابين بالبدانة . حيث يمثل أ- التسلسل الجزيئي لـ (28) عينة و ب- التسلسل الجزيئي لـ (8) عينات مقارنة مع جين *GCG* القياسي الذي تم الحصول عليه من بنك الجينات ، حيث تتابع الشظية Query تمثل العينة ، و التابع المقارن sbjct تمثل قاعدة بيانات المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI) .

من خلال قراءة النتائج المتعلقة بكلتا منطقتي التشفير الاولى والثالثة لجين *GCG* وكما موضح في الجداول ٢-، ٣- والاشكال- ٦-، ٩- تظهر لنا ان الطفرات الموجودة قليلة العدد في كل منطقة تشفير مقارنة لما وجدناه في الجين السابق ، اذ احتوت منطقة التشفير الاولى طفرتين الاولى من نوع الانقلاب (G9573C) Transversion والثانية من نوع الحذف deletion (-C9864) اما منطقة التشفير الثالثة فقد احتوت على طفرتين كلاهما من نوع الانقلاب (A5397G و G5434A) . من خلال نتيجة الدراسة الحالية ان الطفرة deletion (-C9864) التي اظهرتها منطقة التشفير الاولى هي من الطفرات المؤثرة جداً ، اذ تؤدي الى انحراف اطار قراءة القواعد النروجينية framing error or a reading frame shift الذي ينتج عنه كودونات تترجم لاحماض امينية تختلف تماماً عن الاصل وقد تنتج شفرة توقف مبكرة وفي كل الاحوال يكون الناتج النهائي بروتين مغلوط مختلف كلياً عن البروتين الطبيعي . وهذا يدعم نتيجة الدراسة التي بينت انخفاض مستويات GLP-1 في مصل المصابين بالبدانة . اضافة الى ذلك فان الطفرات الثلاثة المتبقية التي هي من نوع الانقلاب كما جاءت به نتائج هذه الدراسة تساهم هي الاخرى من خلال تأثيرها في تغيير

تسلسل الاحماض الامينية لنتاج جين *GCG* (Preproglucagon) وبالتالي تأثيرها السلبي على البوليببتيدات المشتقة منه ومنها *GLP-1*. واكدت دراسات عديدة على علاقة جين *GCG* بالبدانة من خلال الدور الذي يلعبه *GLP-1* كمؤشر للاشباع مؤدياً الى تقليل امتصاص الغذاء من الامعاء [30]، كما يعمل على تنظيم الفراغ المعدي ويحث على تحرير الانسولين وتثبيط افراز الكلوكاكون من البنكرياس كاستجابة الى تناول الطعام [45,32,31]. وفي دراسة [46] اظهرت امكانية استخدام *GLP-1* في علاج البدانة اذ اعطي الاخير لكل من الانسان و القوارض وكانت النتيجة ايجابية اذ انخفض معدل امتصاص الطعام وقل معدل وزن الجسم وهذه الدراسة ايضاً تدعم النتيجة التي حصلنا عليها من انخفاض مستويات *GLP-1* وعلاقتها في البدناء مقارنة بالاصحاء .

مما تقدم نلاحظ قلة او ندرة الدراسات التي تركز في التحري عن وجود طفرات او تغيرات جينية في جين *GCG* وعلاقتها بالبدانة والامراض الاخرى، جاءت هذه الدراسة مسلطة الضوء على هذا الجانب ومحاولة وضع الخطوات الاولى في هذا المجال .

References

1. Yanagiya, T., Tanabe, A., Iida, A., Saito, S., Sekine, A. and Takahashi, A. **2007**. Association of single-nucleotide polymorphisms in MTMR9 gene with obesity. *Hum Mol Genet*, 16(24): 3017-3026.
2. Markison, S. and Foster, A. **2006**. Targeting melanocortin receptors for the treatment of obesity. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 3(4): 569-576.
3. Woodhouse, R. **2008**. Obesity in art: A brief overview. *Front Horm Res*, 36: 271-286.
4. Peeters A., Barendregt, J.J., Willekens, F., Mackenbach, J.P., Al Mamun, A. and Bonneux, L. **2003**. Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: A life-table analysis. *Ann. Intern. Med*, 138(1): 24-32.
5. Nijland, M.L., Stam, F. and Seidell, J.C. **2009**. Overweight in dogs, but not in cats, is related to overweight in their owners. *Public Health Nutr*, 13(1): 1-5.
6. Lund Elizabeth M. **2006**. Prevalence and risk factors for obesity in adult dogs from private US veterinary practices. *Intern J Appl Res Vet Med*, 4(2): 177-186.
7. Rahilly, S. O. and Farooqi, I. S. **2006**. Genetics of obesity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. V.*, 361(1471): 1095-1105.
8. Barness, L.A., Opitz, J.M. and Gilbert-Barness, E. **2007**. Obesity: genetic, molecular, and environmental aspects. *Am. J. Med. Genet*, A143(24): 3016-3024.
9. Walley, A.J., Asher, J.E. and Froguel, P. **2009**. The genetic contribution to non-syndromic human obesity. *Nat. Rev. Genet*, 10(7): 431-442.
10. Hedley, A.A., Ogden, C.L., Johnson, C.L., Carroll, M.D., Curtin, L.R. and Flegal, K.M. **2004**. Prevalence of overweight and obesity among US children, adolescents, and adults, 1999-2002. *Jama*, 291: 2847-2850.
11. Flynn, M.A., McNeil, D.A., Maloff, B., Mutasingwa, D., Wu, M., Ford, C. and Tough, S.C. **2006**. Reducing obesity and related chronic disease risk in children and youth: a synthesis of evidence with 'best practice' recommendations. *Obes Rev.*, 7 Suppl 1: 7-66.
12. Sweeting, H.N. **2007**. Measurement and definitions of obesity in childhood and adolescence: A field guide for the uninitiated. *Nutr J.*, 6: 32.
13. Manson, J.E., Willett, W.C., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Hunter, D.J.; Hankinson, S.E.; Hennekens, C.H. and Speizer, F.E. **1995**. Body weight and mortality among women. *N. Engl. J. Med*, 333(11): 677-685.
14. Arendas, K., Qiu, Q. and Gruslin, A. **2008**. Obesity in pregnancy: pre-conceptional to postpartum consequences. *J Obstet Gynaecol Can*, 30(6): 477-488.
15. Esposito, K., Giugliano, F., Di Palo, C., Giugliano, G., Marfella, R., D'Andrea, F., D'Armiento, M. and Giugliano, D. **2004**. Effect of lifestyle changes on erectile dysfunction in obese men: A randomized controlled trial. *JAMA*, 291(24): 2978-2984.
16. Choi, H.K., Atkinson, K., Karlson, E.W. and Curhan, G. **2005**. Obesity, weight change, hypertension, diuretic use, and risk of gout in men: the health professionals follow-up study. *Arch. Intern. Med.*, 165(7): 742-748.
17. Tsigosa, C., Hainer, V., Basdevant, A., Finer, N., Fried, M., Mathus-Vliegen, E., Micic, D., Maislos, M., Roman, G., Schutz, Y., Toplak, H. and Zahorska-Markiewicz, B. **2008**. Management of obesity in adults: European clinical practice guidelines. *The European Journal of Obesity*, 1(2): 106-116.

18. WHO **2008** . Waist circumference and waist-hip ratio report of a WHO expert consultation (p. 47) . Geneva, Switzerland.
19. Ramachandran, A. and Snehalatha, C. **2010** . Rising burden of obesity in Asia . *J Obes* , 2010 : 868573.
20. Badran, M. and Laher, I. **2011** . Obesity in arabic-speaking countries . *Journal of Obes* , 2011: 686430 , 9 pages .
21. Mansour, A.A. , Al-Hassan, A.A. and Al-Jazairi, M.I. **2007** . Toward establishing normal waist circumference in Eastern Mediterranean and Middle East (Arab) populations. Cutoff values for waist circumference in Iraqi Adults . *Int J Diabetes & Metabolism* , 15(1): 14-16 .
22. Organization of Economic Co-operation and Development (OECD) **2012** . obesity update 2012 . www.oecd.org/health/fitnotfat.
23. Haslam, D.W. and James, W.P. **2005** . Obesity . *Lancet*, 366(9492): 1197-1209 .
24. Schroeder, W.T. , Lopez, L.C. , Harper, M.E. and Saunders, G.F. **1984** . Localization of the human glucagon gene (GCG) to chromosome segment 2q36-37 . *Cytogenet. Cell Genet.* , 38 (1): 76-79 .
25. White, J.W. and Saunders, G.F. **1986** . Structure of the human glucagon gene . *Nucleic Acids Res.* , 14 (12): 4719-4730 .
26. Mojsov, S. , Heinrich, G. , Wilson, I.B. , Ravazzolall, M. , Orcin, L. and Habener, J.F. **1986** . proglucagon gene expression in pancreas . *J. Biol Chem.* , 261(25): 11880-11889 .
27. Leser, T.D. , Gunnarsson, T. , Kildsgaard, J. Pedersen, J.W. and Flambard, F. **2012** . use of a probiotic to regulate body weight . *Patent Application Publication* , 13/256,818 .
28. Reece, J. and Campbell, N. **2002** . *Biology* . San Francisco: Benjamin Cummings .
29. Liljenquist, J.E. , Bomboy, J.D. , Lewis, S.B. , Sinclair-Smith, B.C. , Felts, P.W. , Lacy, W.W. , Crofford, O.B. and Liddle, G.W. **1974** . Effects of glucagon on lipolysis and ketogenesis in normal and diabetic men . *J Clin Invest.* , 53(1):190-197 .
30. Williams, D.L. , Baskin, D.G. and Schwartz, M.W. **2009** . Evidence that intestinal glucagonlike peptide-1 plays a physiological role in satiety . *Endocrinology* , 150(4): 1680-1687 .
31. Woods, S.C. **2005** . Signals that influence food intake and body weight . *Physiol Behav.* , 86(5): 709-716 .
32. Madsbad, S. **2014** . The role of glucagon-like peptide-1 impairment in obesity and potential therapeutic implications . *Diabetes, Obesity and Metabolism* , 16: 9-21 .
33. Holst, J.J. **2007** . The Physiology of glucagon-like peptide 1 . *Physiology Review Journal* , 87(4): 1409-1439 .
34. Tang-Christensen, M. , Larsen, P.J. , Thulesen, J. , Rømer, J. and Vrang, N. **2000** . The proglucagon-derived peptide, glucagon-like peptide-2, is a neurotransmitter involved in the regulation of food intake . *Nat Med* , 6(7):802-807 .
35. Benjamin, M.A. , McKay, D.M. , Yang, P.C. , Cameron, H. and Perdue, M.H. **2000** . Glucagon-like peptide-2 enhances intestinal epithelial barrier function of both transcellular and paracellular pathways in the mouse . *Gut* , 47(1):112-119 .
36. Cani, P.D. , Amar, J. , Iglesias, M.A. , Poggi, M. , Knauf, C. , Bastelica, D. , Neyrinck, A.M. , Fava, F. , Tuohy, K.M. , Chabo, C. , Waget, A. , Delmée, E. , Cousin, B. , Sulpice, T. , Chamontin, B. , Ferrières, J. , Tanti, J.F. , Gibson, G.R. , Casteilla, L. , Delzenne, N.M. , Alessi, M.C. and Burcelin, R. (2007) . Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance . *Diabetes* , 56(7):1761-1772 .
37. Liu, S. , Liu, R. , Chiang, Y.T. , Song, L. , Li, X. , Jin, T. and Wang, Q. **2012** . Insulin detemir enhances proglucagon gene expression in the intestinal L cells via stimulating β -catenin and CREB activities . *Am J Physiol Endocrinol Metab.* , 303(6): E740-751 .
38. Ellingsgaard, H. , Hauselmann, I. , Schuler, B. , Habib, A.M. , Baggio, L.L. , Meier, D.T. , Eppler, E. , Bouzakri, K. , Wueest, S. , Muller, Y.D. , Hansen, A.M.K. , Reinecke, M. , Konrad, D. , Gassmann, M. , Reimann, F. , Halban, P.A. , Gromada, J. , Drucker, D.J. , Gribble, F.M. , Ehses, J.A. and Donath, M.Y. **2011** . Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alphacells . *Nat Med.* , 17(11): 1481-1489 .
39. Gault, V.A. , Bhat, V.K. , Irwin, N. and Flatt, P.R. **2013** . A novel glucagon-like peptide-1 (GLP-1)/glucagon hybrid peptide with triple-acting agonist activity at glucose-dependent insulinotropic polypeptide, GLP-1, and glucagon receptors and therapeutic potential in high fat-fed mice . *J Biol Chem.* , 288(49): 35581-35591 .

40. Taylor, I. , Duthie, H.L. , Cumberland, D.C. and Smallwood, R. **1975** . Glucagon and the colon . *Gut* , 16(12): 973-978 .
41. Patel, G.K. , Whalen, G.E. , Soergel, K.H. , Wu, W.C. and Meade, R.C. **1979** . Glucagon effects on the human small intestine . *Digestive Diseases and Sciences* , 24(7): 501–508 .
42. Tan, T.M. , Field, B.C. , McCullough, K.A. , Troke, R.C. , Chambers, E.S. , Salem, V. , Gonzalez, M.J. , Baynes, K.C. , De Silva, A. , Viardot, A. , Alsafi, A. , Frost, G.S. , Ghatei, M.A. and Bloom, S.R. **2013** . Coadministration of glucagon-like peptide-1 during glucagon infusion in humans results in increased energy expenditure and amelioration of hyperglycemia . *Diabetes* , 62(4): 1131-1138 .
43. Xiao, C. , Pavlic, M. , Szeto, L. , Patterson, B.W. and Lewis, G.F. **2011** . Effects of acute hyperglucagonemia on hepatic and intestinal lipoprotein production and clearance in healthy humans . *Diabetes* , 60(2):383-390 .
44. Habegger, K.M. , Stemmer, K. , Cheng, C. , Müller, T.D. , Heppner, K.M. , Ottaway, N. and Tschöp, M.H. **2013** . Fibroblast growth factor 21 mediates specific glucagon actions . *Diabetes* , 62(5): 1453–1463 .
45. Richard, L. , James, W. D. , Tania, B. A. , Stephen, B. , Alexander, G. and Michael, L.W. **2008** . *Molecular biology of the gene* .6th ed. San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings .
46. Larsen, P.J. , Vrang, N. and Tang-Christensen, M. **2003** . central pre-proglucagon derived peptides: opportunities for treatment of obesity . *Current Pharmaceutical Design* , 9(17):1373-1382 .