

## Analiza molekularna fragmentu genu dla drugiego typu receptora kortykoliberyny w jądlówstręcie psychicznym

### Molecular analysis of the corticotropin-releasing hormone receptor type 2 gene fragment in anorexia nervosa

Alicja Karlik, Eugeniusz Korman, Jarosław Maceluch, Marek Niedziela

Klinika Endokrynologii i Diabetologii Wieku Rozwojowego  
II Katedra Pediatrii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu  
Kierownik: dr hab. n. med. M. Niedziela

#### Summary

**Introduction.** There is strong evidence for the importance of genetic factors in the aetiology of anorexia nervosa (AN). Stress factors can be also associated with the clinical manifestation of AN. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis plays an important role in stress control. The increased activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in AN is caused by corticotropin-releasing hormone hypersecretion. CRH concentration in cerebrospinal fluid is increased in patients with AN. Intracerebral administration of CRH suppresses appetite. CRH receptor type 2 (CRHR 2) is involved in the appetite suppression effects of CRH. Thus CRHR 2 gene can be a candidate gene for AN. Three CRHR 2 splicing isoforms are known:  $\alpha$ , b and g. In the hypothalamus, the main appetite control centre, only the isoform CRHR 2 $\alpha$  is expressed, whose mRNA is characterised by one unique exon 1 $\alpha$ .

**Aim.** The aim of the study was the screening for mutations in exon 1 $\alpha$  of the CRHR 2 gene in patients with AN, which could play a role in the pathogenesis of the disease.

**Methods.** The molecular analysis has been performed in 20 patients with AN and 10 healthy controls. DNA was isolated from peripheral blood leukocytes. DNA fragments were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and sequencing was performed.

**Results.** After screening, no genetic variants have been found in the analysed region, including exon 1 $\alpha$  and the untranslated region, both in anorectic patients as in controls.

**Conclusion.** The results do not confirm the hypothesis that the analysed region of the CRHR 2 gene is involved in the pathogenesis of AN.

*Słowa klucze:* jądlówstręt psychiczny, receptory kortykoliberyny, gen kandydujący

*Key words:* anorexia nervosa, corticotropin releasing hormone receptors, candidate gene

#### Wstęp

Jądlówstręt psychiczny (JP) to zaburzenie odżywiania się charakteryzujące się postępującą utratą masy ciała w wyniku ograniczania przyjmowania pokarmów,

z towarzyszącymi zaburzeniami metabolicznymi i zmianami w układzie neuroendokrynnym.

Etiologia JP jest złożona i wieloczynnikowa. Wyniki wielu badań wskazują na znaczący udział w nim podłoża genetycznego. Stwierdza się zwiększoną częstość występowania JP zarówno wśród krewnych probanda, jak i wśród bliźniąt [1]. Częstość występowania JP wśród bliźniąt monozygotycznych ocenia się na 52–56%, a wśród bliźniąt dizygotycznych na 5–11% [2, 3]. Odziedziczalność podatności zachorowania na JP oceniana jest na około 50–80% [1].

Oprócz czynników genetycznych, na ujawnienie się JP mogą wpływać między innymi czynniki stresowe. Niektórzy badacze podkreślają, że sytuacje stresowe mogą wyzwać nieprawidłowe zachowania związane z jedzeniem, a nawet prowadzić do zaburzeń odżywiania się u osób charakteryzujących się osobowością perfekcyjną [4]. Nierzadko u podłoża choroby leżą różnego rodzaju konflikty domowe czy nadużywanie alkoholu przez członka rodziny. Często stwierdzana nadopiekuńczość rodziców wraz ze stawianiem przez nich dużych wymagań i pobudzaniem ambicji również może przyczyniać się do wytworzenia pewnego rodzaju reakcji lękowych u dzieci. Ponadto u pacjentów z JP stwierdza się trudności w utrzymywaniu kontaktów społecznych, mogące prowadzić do wytworzenia się napięcia emocjonalnego, lęku i w konsekwencji wieloobjawowej reakcji na stres [5]. Z uwagi na zwiększoną częstość ujawniania się JP w okresie dojrzewania pewną rolę w etiologii choroby mogą odgrywać również czynniki psychiczne związane z rozwojem płciowym (zwiększenie się podściółki tłuszczowej u dziewcząt), a także lansowanie przez środki masowego przekazu modelu szczupłej sylwetki ciała.

Określenie anorexia pochodzi z języka greckiego (an – pozbawienie, brak; orexis – apetyt) i oznacza brak łaknienia czy niechęć do pokarmu [6], natomiast anorexia nervosa można przetłumaczyć jako nerwowy zanik apetytu.

W kontrolowaniu reakcji organizmu na stres istotną funkcję spełnia oś podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowa (p-p-n). U pacjentów z JP stwierdza się liczne nieprawidłowości dotyczące funkcjonowania tej osi, jednak wiele badań wskazuje, że przyczyną jej dysfunkcji (pierwotną lub wtórną do zaburzeń w obrębie wyższych pięter ośrodkowego układu nerwowego) jest hipersekrekcja kortykoliberyny. U pacjentów z JP stwierdza się podwyższone stężenie kortykoliberyny w płynie mózgowo-rdzeniowym [7].

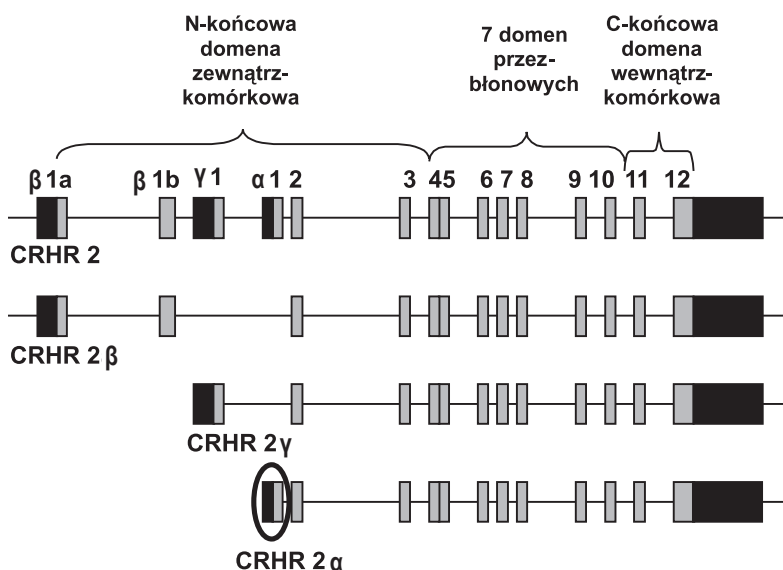
Kortykoliberyna (CRH, ang. corticotropin releasing hormone – hormon uwalniający kortykotropinę) stanowi jedną z wielu substancji wpływających na precyzyjną i skomplikowaną regulację łaknienia. Podanie CRH do ośrodkowego układu nerwowego (oun) powoduje zahamowanie łaknienia [8], a nawet ostry stan anorektyczny [9]. Wpływ na regulację apetytu jest związany z oddziaływaniem na organizm czynników stresowych [10]. Efekt działania CRH na łaknienie oraz zachowania związane ze stresem może zostać odwrócony po zastosowaniu antagonistów receptorów CRH.

Znane są dwa typy receptora dla CRH, które należą do rodziny receptorów związanych z białkiem G, a w transmisji sygnału pośredniczy cAMP [11]. Receptor CRH typu 1 (CRHR 1) bierze udział w indukowaniu prawidłowej reakcji na stres za pośrednictwem ACH, natomiast receptor CRH typu 2 (CRHR 2) wpływa na łaknie-

nie oraz zachowania związane z lękiem. Stymulacja CRHR 2 hamuje łaknienie [12]. Stwierdzono, że antagonistą CRHR 2 osłabia efekt działania CRH na łaknienie, co nie zostało zaobserwowane po podaniu antagonisty CRHR 1 [12]. Ponadto podanie CRH do oun zmniejsza łaknienie zarówno u myszy pozbawionych receptora typu 1, jak i u myszy o typie dzikim [13].

Receptor CRHR typu 2 występuje w postaci trzech izoform:  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ , które charakteryzują się odmiennymi N-końcowymi domenami zewnątrzkomórkowymi [14]. W obrębie podwzgórza, głównego ośrodka regulacji łaknienia, ekspresję wykazuje izoforma  $\alpha$  CRHR 2 [11, 15].

Gen dla receptora CRH typu 2 może być genem kandydującym w jadłowstrecie psychicznym. Znajduje się on na chromosomie 7 (locus p11-p15) [16] i składa się z 40 tysięcy par zasad (pz), a część kodująca obejmuje 12 egzonów (rys. 1).



Rys. 1. Schematyczna budowa genu CRHR 2 (na podstawie: Catalano RD, Kyriakou T, Chen J, Easton A, Hillhouse EW. *Regulation of corticotropin-releasing hormone type 2 receptors by multiple promoters and alternative splicing: identification of multiple splice variants*. Mol. Endocrinol. 2003; 17: 395–410 [18]; prostokąty szare przedstawiają egzony, prostokąty czarne – fragmenty nie podlegające translacji (UTR), linie ciągłe odpowiadają intronom. Zaznaczono fragment genu objęty analizą.

Poprzez alternatywne składanie końca 5' łańcucha mRNA powstają izoformy:  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ . mRNA izoformy  $\alpha$  zawiera unikalny egzon o długości 103 pz. W łańcuchu DNA po egzonie 1a następuje część niekodująca o długości 137 pz, która poprzedza egzon 2 (126 pz), stanowiący pierwszy wspólny dla wszystkich izoform fragment [17]. Fragment UTR izoformy  $\alpha$  (ang. untranslated region – region nie podlegający translacji) obejmuje około 207 pz [18]. We fragmencie UTR mogą znajdować się sekwencje regulatorowe genu wpływające na proces transkrypcji danego genu. Egzon

1 $\alpha$  CRHR 2 koduje unikalny fragment białka części N-końcowej peptydu o długości 34 aminokwasów [17]. 17 pierwszych aminokwasów stanowi fragment sygnałowy receptora, natomiast kolejnych 17 – obejmuje fragment pierwszej domeny zewnątrzkomórkowej.

Celem badania było poszukiwanie mutacji w egzonie 1 $\alpha$  genu CRHR 2 w JP mogących odgrywać rolę w patogenezie choroby.

### Pacjenci

Badaniem objęto 20 pacjentek w wieku od 13 do 23 lat (średnia wieku 18,4 roku) z rozpoznaniem, zgodnie z kryteriami diagnostycznymi wg klasyfikacji ICD-10 [19] oraz DSM-IV [20], jadłowstrętem psychicznym, hospitalizowanych w Klinice Endokrynologii i Diabetologii Wieku Rozwojowego oraz w Klinice Psychiatrii Dzieci i Młodzieży w Poznaniu w latach 2004–2005 (18 pacjentek – typ restrykcyjny JP, 2 pacjentki - typ bulimiczny JP).

Grupę kontrolną stanowiło 10 zdrowych osób w wieku od 26 do 36 lat (średnia wieku 30,4 roku), z należną masą ciała powyżej 85%, z ujemnym klinicznym wywiadem osobniczym i wywiadem rodzinnym dotyczącym zaburzeń odżywiania się oraz chorób psychicznych. Różnica wieku w obu grupach umożliwiła ograniczenie włączenia do grupy kontrolnej osób ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na JP.

Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej. Wszystkie badane osoby po pełnym poinformowaniu wyraziły pisemną zgodę na przeprowadzenie badania.

### Metoda

Analiza molekularna obejmowała izolację DNA z leukocytów krwi obwodowej, amplifikację DNA metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), elektroforezę w żelu agarozowym oraz sekwencjonowanie produktów PCR. Celem doświadczenia było uzyskanie amplifikacji fragmentu genu CRHR 2 obejmującego egzon 1 $\alpha$  (103 pary zasad). Do amplifikacji użyto następujących starterów:

CRHR 2 for: 5' GAGACTGAGCCCCTCCGAGA 3',

CRHR 2 rev: 5' GGTGTAGAGCAGGCAGCGAG 3'.

Startery zostały zaprojektowane w taki sposób, aby amplifikować większy fragment genu, co rozszerzyło obszar analizy. W wyniku reakcji PCR z użyciem tych starterów uzyskano produkt wielkości 699 pz.

### Wyniki

W wyniku sekwencjonowania produktu reakcji PCR o długościach 699 pz uzyskano sekwencję nukleotydową badanego fragmentu genu CRHR 2 (Pracownia Techniki Biologii Molekularnej Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu). W wyniku jednej reakcji sekwencjonowania uzyskano sekwencję części 5' produktu PCR o łącznej długości 310 pz (odcinek 91 pz – 401 pz), obejmującą egzon 1 $\alpha$  (103 pz) oraz region nie podlegający translacji (207 pz). Po przeprowadzeniu analizy

uzyskanej sekwencji fragmentu genu dla drugiego typu receptora kortykoliberyny nie stwierdzono wariantów genetycznych w grupie badanej oraz kontrolnej.

### Omówienie

W ostatnich latach obserwuje się znaczny postęp technologiczny w dziedzinie genetyki molekularnej. Zakłada się, że wyniki badań genetycznych umożliwią identyfikację genów związanych z patogenezą choroby.

Jakkolwiek istnieją liczne przekonujące dane dotyczące udziału czynnika genetycznego w patogenezie JP, to jednak badania molekularne nie są wykonywane często. Jak dotąd, przeprowadzono nieliczne badania genetyczne obejmujące geny wpływające na regulację łaknienia, mogące stanowić geny kandydujące w JP. Stwierdzone warianty genetyczne w obrębie poszczególnych genów były następnie poddawane badaniom asocjacyjnym. Przeprowadzone badania dotyczyły genów w układzie serotonergicznym [21–32], dopaminergicznym [33–36], melanokortynowym [37, 38], genów receptorów estrogenowych [39, 40], neuropeptydu Y [41], receptora  $\beta$ 3-adrenergicznego [42], a także genów leptyny [43], AgRP (Agouti Related Protein, białko z rodziny Agouti) [44], białek rozprzegających [45] oraz czynnika neurotropowego pochodzenia mózgowego [46]. Według dostępnej obecnie wiedzy nie przeprowadzono jak dotąd żadnego badania molekularnego oceniającego występowanie wariantów genetycznych w obrębie układu CRH w JP. Prezentowane badanie obejmujące grupę osób z JP jest badaniem o charakterze nowatorskim.

Na podstawie wyników przeprowadzonego badania nie można stwierdzić, że badany fragment genu dla drugiego typu receptora kortykoliberyny uczestniczy w patogenezie JP. Niestwierdzenie wariantów genetycznych w obrębie badanego niewielkiego fragmentu genu może być związane ze stosunkowo małą grupą objętą badaniem. Uzyskany wynik wskazuje jednak, że powiększenie grupy badanej wiąże się z bardzo małym prawdopodobieństwem otrzymania wyniku statystycznie istotnego. Wobec powyższego uzyskany wynik wyznacza kierunki dalszych poszukiwań, obejmujących badanie pozostałej części genu CRHR 2 $\alpha$  czy całego genu CRHR 2 wraz z badaniami asocjacyjnymi w przypadku występowania polimorficznych pozycji nukleotydowych. Ze względu na prawdopodobny udział układu kortykoliberyny w etiopatogenezie jadłowstrętu psychicznego celowe byłoby również poddanie badaniom molekularnym pozostałych składowych układu CRH, a także przeprowadzenie badań umożliwiających uzyskanie informacji dotyczących ekspresji tego genu czy funkcjonowania kompleksu ligand–receptor w obrębie ośrodkowego układu nerwowego, co nie jest możliwe do wykonania w warunkach *in vivo*.

### Wnioski

1. Nie stwierdzono mutacji w egzonie 1 $\alpha$  genu dla drugiego typu receptora kortykoliberyny w jadłowstręcie psychicznym.
2. Na podstawie wyników przeprowadzonego badania nie można stwierdzić, że fragment genu dla drugiego typu receptora kortykoliberyny, obejmujący egzon 1 $\alpha$ , wywiera wpływ na patogenezę jadłowstrętu psychicznego.

3. Niestwierdzenie zmian w sekwencji badanego fragmentu genu dla drugiego typu receptora kortykoliberyny wyznacza kierunki poszukiwania mutacji w pozostalej części tego genu w jądłowstręcie psychicznym.

### **Молекулярный анализ фрагмента гена для второго типа рецептора кортиколиберина при психической анорексии**

#### **Содержание**

**Введение.** В этиологии психической анорексии значительную роль играют генетические факторы. На проявление этого синдрома могут влиять также и стрессовые ситуации. В контролировании реакции организма на стресс существенную функцию играет подбугрово–гипофизарно–надпочечниковая ось. Причиной дисфункции этой оси при психической анорексии является гиперсекреция кортиколиберина (СКЛ). У пациентов с психической анорексией находится повышенная концентрация СКЛ в спинно-мозговой жидкости. Введение кортиколиберина в центральную нервную систему тормозит аппетит посредством рецептора СКЛ типа 2 (СКЛ-2). Ген для второго типа рецептора СКЛ может быть кандидирующим геном при психической анорексии. Этот последний присутствует в форме информина альфа, бэта и ипсилон. В гипофизе, главном центре регуляции аппетита, экспрессия наблюдается только в инфолинии альфа СКЛ-2, которой м РНК характеризуется присутствием уникального эгзона 1-альфа.

**Задание.** Изыскание функциональной мутации в эгзоне 1-альфа гена СКЛ 2 у пациентов с психической анорексией.

**Методы.** Исследование проведено у 20 пациенток с психической анорексией и 10 женщин контрольной группы. РНК выделена из лейкоцитов периферической крови. Имплификация методом цепной реакции полимеразы фрагмент гена подвергнуты секвенционированию.

**Результаты.** После проведения анализа секвенции фрагмента гена для второго типа рецептора кортиколиберина, охватывающего эгзон 1-альфа, а также участок не подвергающийся трансляции, не отмечено вариантов генетического типа в исследованной и контрольной группах.

**Выводы.** На основании результатов проведенного исследования нельзя подтвердить, что фрагмент гена для второго типа рецептора кортиколиберина, охватывающий 1-альфа, оказывает влияние на патогенез психической анорексии.

### **Molekulare Analyse des Genabschnitts für den zweiten Typ des Corticoliberin - Rezeptors in Anorexia nervosa**

#### **Zusammenfassung**

**Einleitung.** In der Ätiologie der Anorexia nervosa spielen die genetischen Faktoren eine signifikante Rolle. Auf das Erscheinen der Anorexia nervosa können auch Stressfaktoren einen Einfluss haben. In der Kontrolle der Reaktion des Organismus auf den Stress spielt die hypothalamisch - hypophysär - adrenale Achse eine bedeutende Funktion. Die Ursache für die Dysfunktion dieser Achse in der Anorexia nervosa ist die Hypersekretion von Corticoliberin (CRH). Bei den Patienten mit Anorexia wird eine erhöhte Konzentration von CRH in der Zerebrospinalflüssigkeit festgestellt. Die Einreichung von CRH in das zentrale Nervensystem hemmt den Appetit durch den CRH - Rezeptor vom Typ 2 (CRHR 2). Der Gen für den zweiten Typ des CRH - Rezeptors kann der Kandidatgen in der Anorexia nervosa sein. CRHR 2 tritt in der Form der Isoform  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  auf. Im Hypothalamus, dem Hauptzentrum der Appetitregulierung, zeigt nur die Isoform  $\alpha$  CRHR 2 eine Expression, deren mRNA sich mit der Anwesenheit vom einzigartigen Exon 1 $\alpha$  charakterisiert.

**Ziel.** Das Ziel der Studie war die Suche nach der funktionellen Mutation im Exon 1  $\alpha$  des CRHR 2 Gens bei Patienten mit Anorexia nervosa.



**Methoden.** An die Studie wurden 20 Patientinnen mit Anorexia nervosa und 10 Frauen aus der Kontrollgruppe eingeschlossen. Die DNS wurde aus den Leukozithen des periphären Bluts isoliert. Die mit der Kettenreaktion von Polymerase implifizierten Genabschnitte wurden sequenziert.

**Ergebnisse.** Nach der Analyse der Sequenz des Genabschnitts für den zweiten Typ des Corticoliberin - Rezeptors, der Exon 1 $\alpha$  umfasst, und auch den Bereich, der der Translation nicht unterliegt, wurden keine genetischen Varianten in der untersuchten Gruppe und in der Kontrollgruppe festgestellt.

**Schlussfolgerungen.** Nach den Ergebnissen der durchgeführten Studie kann man nicht feststellen, dass der Genabschnitt für den zweiten Typ des Corticoliberin - Rezeptors, der Exon 1 $\alpha$  umfasst, einen Einfluss auf die Pathogenese der Anorexia nervosa hat.

### L'analyse moléculaire du fragment du deuxième type du gène du récepteur de la corticolibérine (CRH) au cours de l'anorexie mentale

#### Résumé

**Introduction.** Les facteurs génétiques jouent le rôle important dans l'étiologie de l'anorexie mentale. Il en est de même avec les facteurs du stress. L'axe hypothalamique-pituitaire-surrénale contrôle les réactions de l'organisme au stress. L'accroît de l'activité de cet axe cause l'hypersécrétion de corticolibérine (CRH) chez les patients souffrant de l'anorexie mentale. L'administration intracérébrale de CRH diminue l'appétit par l'intermédiaire du récepteur CRH type 2 (CRHR 2). Ce gène CRHR 2 peut être le gène candidat dans l'anorexie mentale. Il se présente comme isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Dans l'hypothalamus, lieu principal de la régulation de l'appétit, on voit seulement l'expression de l'isoforme  $\alpha$  de CRHR 2, dont mRNA note la présente de l'exon unique 1  $\alpha$ .

**Objectif.** Ce travail vise à chercher la mutation fonctionnelle de l'exon 1 $\alpha$  de CRHR 2 chez les patients souffrant de l'anorexie mentale.

**Méthode.** On examine 20 patientes souffrant de l'anorexie mentale et 10 femmes saines du groupe de contrôle. On a isolé leur DNA des leucocytes du sang périphérique. Les fragments de DNA sont amplifiés avec la méthode PCR (la réaction par chaîne par polymérase) et ensuite ils ont subi le séquençage.

**Résultats.** Après le dépistage du fragment du gène CRHR 2 y compris l'exon 1  $\alpha$  et la région sans la traduction génétique, on ne trouve pas de variants génétiques dans le groupe de patientes et dans le groupe de contrôle.

**Conclusions.** Ces résultats n'attestent pas l'hypothèse que le fragment analysé du gène CRHR 2 contenant l'exon 1  $\alpha$  influe sur l'étiologie de l'anorexie mentale.

#### Piśmiennictwo

1. Kipman A, Gorwood P, Mouren-Simeoni MC, Ades J. *Genetic factors in anorexia nervosa*. Eur. Psychiatry 1999; 14: 189–198.
2. Lilenfeld LR, Kaye WH, Greeno CG, Merikangas KR, Plotnicov K, Pollice C, Rao R, Strober M, Bulik CM, Nagy L. *A controlled family study of anorexia nervosa and bulimia nervosa: psychiatric disorders in first-degree relatives and effects of proband comorbidity*. Arch. Gen. Psychiatry 1998; 55: 603–610.
3. Holland AJ, Hall A, Murray R, Russell GF, Crisp AH. *Anorexia nervosa: a study of 34 twin pairs and one set of triplets*. Brit. J. Psychiatry 1984; 145: 414–419.
4. Ruggiero GM, Levi D, Ciuna A, Sassaroli S. *Stress situation reveals an association between perfectionism and drive for thinness*. Int. J. Eat. Disord. 2003; 34: 220–226.
5. Brambilla F. *Social stress in anorexia nervosa: a review of immuno-endocrine relationships*. Physiol. Behav. 2001; 73: 365–369.
6. Józefik B. *Epidemiologia zaburzeń odżywiania się*. W: Józefik B, red. *Anoreksja i bulimia psychiczna. Rozumienie i leczenie zaburzeń odżywiania się*. Kraków: Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego; 1999, s. 22–29.

7. Kaye WH, Gwirtsman HE, George DT, Ebert MH, Jimerson DC, Tomai TP, Chrousos GP, Gold PW. *Elevated cerebrospinal fluid levels of immunoreactive corticotropin-releasing hormone in anorexia nervosa: relation to state of nutrition, adrenal function, and intensity of depression*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1987; 64: 203–208.
8. Glowa JR, Barrett JE, Russell J, Gold PW. *Effects of corticotropin releasing hormone on appetitive behaviors*. Peptides 1992; 13: 609–621.
9. Krahn DD, Gosnell BA, Majchrzak MJ. *The anorectic effects of CRH and restraint stress decrease with repeated exposures*. Biol. Psychiatry 1990; 15: 1094–1102.
10. Krahn DD, Gosnell BA, Grace M, Levine AS. *CRF antagonist partially reverses CRF- and stress-induced effects on feeding*. Brain Res. Bull. 1986; 17: 285–289.
11. Chalmers DT, Lovenberg TW, De Souza EB. *Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression*. J. Neurosci. 1995; 15: 6340–6350.
12. Pellemounter MA, Joppa M, Carmouche M, Cullen MJ, Brown B, Murphy B, Grigoriadis DE, Ling N, Foster AC. *Role of corticotropin-releasing factor (CRF) receptors in the anorexic syndrome induced by CRF*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2000; 293: 799–806.
13. Contarino A, Dellu F, Koob GF, Smith GW, Lee KF, Vale WW, Gold LH. *Dissociation of locomotor activation and suppression of food intake induced by CRF in CRFR1-deficient mice*. Endocrinol. 2000; 141: 2698–2702.
14. Kostich WA, Chen A, Sperle K, Largent BL. *Molecular identification and analysis of a novel human corticotropin-releasing factor (CRF) receptor: the CRF2 gamma receptor*. Mol. Endocrinol. 1998; 12: 1077–1085.
15. Lovenberg TW, Chalmers DT, Liu C, De Souza EB. *CRF2 alpha and CRF2 beta receptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues*. Endocrinol. 1995; 136: 4139–4142.
16. Meyer AH, Ullmer C, Schmuck K, Morel C, Wishart W, Lubbert H, Engels P. *Localization of the human CRF2 receptor to 7p21-p15 by radiation hybrid mapping and FISH analysis*. Genom. 1997; 15: 189–190.
17. Liaw CW, Lovenberg TW, Barry G, Oltersdorf T, Grigoriadis DE, de Souza EB. *Cloning and characterization of the human corticotropin-releasing factor-2 receptor complementary deoxyribonucleic acid*. Endocrinol. 1996; 137: 72–77.
18. Catalano RD, Kyriakou T, Chen J, Easton A, Hillhouse EW. *Regulation of corticotropin-releasing hormone type 2 receptors by multiple promoters and alternative splicing: identification of multiple splice variants*. Mol. Endocrinol. 2003; 17: 395–410.
19. *International statistical classification of diseases and related health problems (ICD-10). Clinical descriptions and guidelines*. World Health Organization; 1992, s. 352–353.
20. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-IV)*: Washington, DC: American Psychiatric Association; 1994, s. 538–545.
21. Collier DA, Arranz MJ, Li T, Mupita D, Brown N, Treasure J. *Association between 5-HT2A gene promoter polymorphism and anorexia nervosa*. Lancet 1997; 9: 412.
22. Sorbi S, Nacmias B, Tedde A, Ricca V, Mezzani B, Rotella CM. *5-HT2A promoter polymorphism in anorexia nervosa*. Lancet 1998; 13: 1785.
23. Enoch MA, Kaye WH, Rotondo A, Greenberg BD, Murphy DL, Goldman D. *5-HT2A promoter polymorphism -1438G/A, anorexia nervosa, and obsessive-compulsive disorder*. Lancet 1998; 13: 1785–1786.
24. Nacmias B, Ricca V, Tedde A, Mezzani B, Rotella CM, Sorbi S. *5-HT2A receptor gene polymorphisms in anorexia nervosa and bulimia nervosa*. Neurosc. Lett. 1999; 24: 134–136.
25. Hinney A, Ziegler A, Nothen MM, Remschmidt H, Hebebrand J. *5-HT2A receptor gene polymorphisms, anorexia nervosa, and obesity*. Lancet 1997; 1: 1324–1325.



26. Campbell DA, Sundaramurthy D, Markham AF, Pieri LF. *Lack of association between 5-HT2A gene promoter polymorphism and susceptibility to anorexia nervosa*. *Lancet* 1998; 14: 499.
27. Ziegler A, Hebebrand J, Gorg T, Rosenkranz K, Fichter M, Herpertz-Dahlmann B, Remschmidt H, Hinney A. *Further lack of association between the 5-HT2A gene promoter polymorphism and susceptibility to eating disorders and a meta-analysis pertaining to anorexia nervosa*. *Mol. Psychiatry* 1999; 4: 410–412.
28. Ando T, Komaki G, Karibe M, Kawamura N, Hara S, Takii M, Naruo T, Kurokawa N, Takei M, Tatsuta N, Ohba M, Nozoe S, Kubo C, Ishikawa T. *5-HT2A promoter polymorphism is not associated with anorexia nervosa in Japanese patients*. *Psychiatr. Genet.* 2001; 11: 157–160.
29. Rybakowski F, Slopian A, Dmistrz-Weglarz M, Czernski P, Hauser J, Rajewski A. *Association study of 5-HT2A receptor gene polymorphism in anorexia nervosa in Polish population*. *Psychiatr. Pol.* 2003; 37: 47–55.
30. Hinney A, Herrmann H, Lohr T, Rosenkranz K, Ziegler A, Lehmkuhl G, Poustka F, Schmidt MH, Mayer H, Siegfried W, Remschmidt H, Hebebrand J. *No evidence for an involvement of alleles of polymorphisms in the serotonin 1D beta and 7 receptor genes in obesity, underweight or anorexia nervosa*. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 1999; 23: 760–763.
31. Han L, Nielsen DA, Rosenthal NE, Jefferson K, Kaye W, Murphy D, Altemus M, Humphries J, Cassano G, Rotondo A, Virkkunen M, Linnoila M, Goldman D. *No coding variant of the tryptophan hydroxylase gene detected in seasonal affective disorder, obsessive-compulsive disorder, anorexia nervosa, and alcoholism*. *Biol. Psychiatry* 1999; 1: 615–619.
32. Hinney A, Barth N, Ziegler A, von Prittwitz S, Hamann A, Hennighausen K, Pirke KM, Heils A, Rosenkranz K, Roth H, Coners H, Mayer H, Herzog W, Siegfried A, Lehmkuhl G, Poustka F, Schmidt MH, Schafer H, Grzeschik KH, Lesch KP, Lentjes KU, Remschmidt H, Hebebrand J. *Serotonin transporter gene-linked polymorphic region: allele distributions in relationship to body weight and in anorexia nervosa*. *Life Sc.* 1997; 61: 295–303.
33. Bruins-Slot L, Gorwood P, Bouvard M, Blot P, Ades J, Feingold J, Schwartz JC, Mouren-Simeoni MC. *Lack of association between anorexia nervosa and D3 dopamine receptor gene*. *Biol. Psychiatry* 1998; 1: 76–78.
34. Hinney A, Schneider J, Ziegler A, Lehmkuhl G, Poustka F, Schmidt MH, Mayer H, Siegfried W, Remschmidt H, Hebebrand J. *No evidence for involvement of polymorphisms of the dopamine D4 receptor gene in anorexia nervosa, underweight, and obesity*. *Am. J. Med. Genet.* 1999; 15: 594–597.
35. Gabrovsek M, Brecelj-Anderluh M, Bellodi L, Cellini E, Di Bella D, Estivill X, Fernandez-Aranda F, Freeman B, Geller F, Gratacos M, Haigh R, Hebebrand J, Hinney A, Holliday J, Hu X, Karwautz A, Nacmias B, Ribases M, Remschmidt H, Komel R, Sorbi S, Tomori M, Treasure J, Wagner G, Zhao J, Collier DA. *Combined family trio and case-control analysis of the COMT Val158Met polymorphism in European patients with anorexia nervosa*. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2004; 1: 68–72.
36. Mikolajczyk E, Smiarowska M, Grzywacz A, Samochowiec J. *Association of eating disorders with catechol-o-methyltransferase gene functional polymorphism*. *Neuropsychobiol.* 2006; 54: 82–86.
37. Hinney A, Becker I, Heibult O, Nottebom K, Schmidt A, Ziegler A, Mayer H, Siegfried W, Blum WF, Remschmidt H, Hebebrand J. *Systematic mutation screening of the pro-opiomelanocortin gene: identification of several genetic variants including three different insertions, one nonsense and two missense point mutations in probands of different weight extremes*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998; 83: 3737–3741.
38. 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; 84: 1483–1486.

39. Eastwood H, Brown KM, Markovic D, Pieri LF. *Variation in the ESR1 and ESR2 genes and genetic susceptibility to anorexia nervosa*. Mol. Psychiatry 2002; 7: 86–89.
40. Rosenkranz K, Hinney A, Ziegler A, Hermann H, Fichter M, Mayer H, Siegfried W, Young JK, Remschmidt H, Hebebrand J. *Systematic mutation screening of the estrogen receptor beta gene in probands of different weight extremes: identification of several genetic variants*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1998; 83: 4524–4527.
41. Rosenkranz K, Hinney A, Ziegler A, von Prittwitz S, Barth N, Roth H, Mayer H, Siegfried W, Lehmkühl G, Poustka F, Schmidt M, Schafer H, Remschmidt H, Hebebrand J. *Screening for mutations in the neuropeptide Y Y5 receptor gene in cohorts belonging to different weight extremes*. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. 1998; 22: 157–163.
42. Hinney A, Lentjes KU, Rosenkranz K, Barth N, Roth H, Ziegler A, Hennighausen K, Coners H, Wurmser H, Jacob K, Romer G, Winnikes U, Mayer H, Herzog W, Lehmkühl G, Poustka F, Schmidt MH, Blum WF, Pirke KM, Schafer H, Grzeschik KH, Remschmidt H, Hebebrand J. *Beta 3-adrenergic-receptor allele distributions in children, adolescents and young adults with obesity, underweight or anorexia nervosa*. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. 1997; 21: 224–230.
43. Hinney A, Bornscheuer A, Depenbusch M, Mierke B, Tolle A, Middeke K, Ziegler A, Roth H, Gerber G, Zamzow K, Ballauff A, Hamann A, Mayer H, Siegfried W, Lehmkühl G, Poustka F, Schmidt MH, Hermann H, Herpertz-Dahlmann BM, Fichter M, Remschmidt H, Hebebrand J. *No evidence for involvement of the leptin gene in anorexia nervosa, bulimia nervosa, underweight or early onset extreme obesity: identification of two novel mutations in the coding sequence and a novel polymorphism in the leptin gene linked upstream region*. Mol. Psychiatry 1998; 3: 539–543.
44. Vink T, Hinney A, van Elburg AA, van Goozen SH, Sandkuijl LA, Sinke RJ, Herpertz-Dahlmann BM, Hebebrand J, Remschmidt H, van Engeland H, Adan RA. *Association between an agouti-related protein gene polymorphism and anorexia nervosa*. Mol. Psychiatry 2001; 6: 325–328.
45. Campbell DA, Sundaramurthy D, Gordon D, Markham AF, Pieri LF. *Association between a marker in the UCP-2/UCP-3 gene cluster and genetic susceptibility to anorexia nervosa*. Mol. Psychiatry 1999; 4: 68–70.
46. Ribases M, Gratacos M, Fernandez-Aranda F, Bellodi L, Boni C, Anderluh M, Cavallini MC, Cellini E, Di Bella D, Erzegovesi S, Foulon C, Gabrovsek M, Gorwood P, Hebebrand J, Hinney A, Holliday J, Hu X, Karwautz A, Kipman A, Komel R, Nacmias B, Remschmidt H, Ricca V, Sorbi S, Wagner G, Treasure J, Collier DA, Estivill X. *Association of BDNF with anorexia, bulimia and age of onset of weight loss in six European populations*. Hum. Mol. Genet. 2004; 15: 1205–1212.

Adres: Alicja Karlik  
Klinika Endokrynologii i Diabetologii Wieku Rozwojowego  
II Katedra Pediatrii UM im. Karola Marcinkowskiego  
60-572 Poznań, ul. Szpitalna 27/33

Otrzymano: 15.01.2007  
Zrecenzowano: 20.03.2007  
Przyjęto do druku: 2.10.2007