

LAPORAN AKHIR PENYELIDIKAN

*Analysis of Leptin receptor, Glucocorticoid receptor,  
 $\beta_3$ -Adrenergic receptor and Tumour Necrosis Factor- $\alpha$   
Gene Polymorphism in Type 2 Diabetes Mellitus in  
Kelantan Malays.*

Oleh: Prof. Madya Dr. Nizam B. Isa

Dr. Abd. Aziz Al-Safi B. Ismail

Profesor Mafauzy B. Mohamed

BAHAGIAN PENYELIDIKAN & PEMBANGUNAN  
CANSELORI  
UNIVERSITI SAINS MALAYSIA



Laporan Akhir Projek Penyelidikan Jangka Pendek

1) Nama Penyelidik: Prof. Madya Dr. Mohd. Nizam B. Isa

Nama Penyelidik-Penyelidik Lain (Jika berkaitan) : Dr. Abd. Aziz Al-Safi B. Ismail  
Profesor Mafauzy B. Mohamed

2) Pusat Pengajian/Pusat/Unit : Pusat Pengajian Sains Perubatan / Pusat Genom Manusia

3) Tajuk Projek: Analysis of Leptin receptor, Glucocorticoid receptor,  $\beta_3$ -Aderenergic receptor and Tumour Necrosis Factor- $\alpha$  Gene Polymorphism in Type 2 Diabetes Mellitus in Kelantan Malays.

BAHAGIAN PENYELIDIKAN,  
PUSAT PENGAJIAN SAINS PERUBATAN  
UNIVERSITI SAINS MALAYSIA  
USM KK/PPSP/R & D  
Bilangan : 216. (12)  
Tarikh : 26.10.2003

USM J/P-06 - 1

BAHAGIAN PENYELIDIKAN  
PUSAT PENGAJIAN SAINS PERUBATAN  
SALINAN :  
 Bhg. Penyelidikan, PPSP  
 Perpustakaan Perubatan, USMKK  
 RCMO  
Tangan : [Signature] Tarikh : 26.10.03

***Analisa polimorfisma gen reseptor Leptin, reseptor Glukokortikoid, reseptor  $\beta$ 3-adrenergik dan Faktor Nekrosis Tumor alfa (Tnf- $\alpha$ ) pada pesakit Diabetes jenis 2 di kalangan Melayu Kelantan.***

**Abstrak**

Diabetes adalah penyakit kompleks dengan faktor genetik dan persekitaran berperanan dalam patogenesis dalam penyakit ini. Perkembangan dalam bidang genetik manusia memberi lebih kefahaman dalam penyelidikan terhadap pengaruh gen yang rentan terhadap diabetes samada secara spesifik atau pelbagai. Sejak 3 tahun kebelakangan, beberapa kajian melibatkan gen reseptor Leptin, reseptor Glukokortikoid, reseptor  $\beta$ 3-adrenergik dan Faktor Nekrosis Tumor alfa (Tnf- $\alpha$ ) telah menunjukkan perhubungan antara polimorfisma gen-gen ini dengan diabetes. Walaubagaimanapun, prevalens penglibatan dan variasi polimorfisma berbeza dengan ketara di antara kumpulan etnik yang berlainan.

Dalam kajian ini, pemilihan calon-calon gen dilakukan berdasarkan tapak jalan biologi yang berkemungkinan terlibat dalam perkembangan dan kemajuan diabetes jenis 2. Teknologi yang berpotensi mengenalpasti variasi-variasi ini tidak hanya menyumbang kepada pemahaman mengenai patogenesis diabetes jenis 2 dengan lebih baik tetapi menyediakan peluang penyelidikan bagi menilai dan meneliti asosiasi pelbagai penanda genetik dengan penyakit ini. Kami menjangkakan untuk mengesahkan perhubungan antara polimorfisma gen-gen ini dengan patogenesis Diabetes dalam populasi tempatan.

**Objektif:**

Tujuan kajian ini dijalankan adalah:

- 1) Untuk mengenalpasti perhubungan gen reseptor Leptin, reseptor Glukokortikoid, reseptor  $\beta$ 3-adrenergik dan Faktor Nekrosis Tumor alfa (Tnf- $\alpha$ ) dengan diabetes pada Melayu Kelantan.
- 2) Untuk mencirikan gen utama yang rentan terhadap diabetes jenis 2 pada masyarakat Melayu Kelantan.
- 3) Untuk memulakan latarbelakang dasar / kerjaperlu diperingkat awalan untuk kajian epidemiologi genetik dan keluarga dalam diabetes jenis 2 di Malaysia.

## **Metodologi Penyelidikan**

*Subjek dan Kawalan.* 50 pesakit yang disahkan menghidap Diabetes yang hadir ke Klinik diabetes di HUSM telah dipilih sebagai subjek. Pesakit diambil data klinikal seperti jantina, umur, berat badan, ukuran tekanan darah dan analisa biokimia termasuk HbA1c dan 'fasting blood sugar (FBS). Sempel kawalan adalah individu yang normal yang tidak menghidap diabetes. Sebanyak 10ml darah diambil daripada subjek dan kawalan dan disimpan dalam tiub EDTA untuk pengekstrakan DNA dan analisa genetik berikutnya.

*Pengenalpastian genetik.* DNA genomik diekstrak daripada sampel di atas menggunakan kaedah piawai yang digunakan di Pusat Genom Manusia, USM. DNA genomik diampifikasi menggunakan set primer dan syarat-syarat Reaksi Berantai Polimerase (PCR) yang spesifik mengikut kajian-kajian yang telah diterbitkan dengan sedikit ubahsuai. Teknik Pengasingan Polimorfisma Fragmen Panjang (RFLP) menggunakan enzim restriksi yang spesifik terhadap fragmen yang dikaji digunakan bagi mengenalpasti polimorfisma yang berlaku. Kedua-dua hasil PCR dan RFLP dianalisa dengan menggunakan kaedah elektroforesis agaros atau PAGE bagi pengenalpastian alel (Rajah 1).

*Analisa Statistik* Ujian chi-square dilakukan bagi membandingkan kekerapan genotip dan aras variasi di antara kumpulan genotip dibanding menggunakan ujian variasi ANOVA. Nilai  $p$  kurang daripada 0.05 diterima sebagai keertian secara statistik.

## **Keputusan**

Hasil kajian yang dilakukan terhadap keempat-empat gen pada sampel pesakit DM jenis 2 tersebut mendapati kekerapan alel bermutasi adalah diantara 4.0% hingga 32.0% secara keseluruhannya. Kekerapan tertinggi ditunjukkan oleh polimorfisma penyelitan/ delesi di kawasan 3'-tak terjemah (3'-UTR) pada gen

reseptor Leptin (17.0%), diikuti oleh polimorfisma Trp<sup>64</sup>Arg pada gen reseptor  $\beta_3$ -adrenergik (10.0%), diikuti oleh polimorfisma Asn<sup>363</sup>Ser pada gen reseptor Glukokortikoid (4.0%) dan yang terakhir adalah polimorfisma G<sup>-308</sup>A pada kawasan promoter gen Faktor Nekrosis Tumor alfa (3.0%). Manakala keputusan analisa polimorfisma dilakukan pada sampel normal pula mendapati kekerapan genotip bermutasi bagi gen reseptor Leptin adalah 16.0%, gen Faktor Nekrosis Tumor alfa adalah 7.0%, gen reseptor Glukokortikoid 3.0% dan gen reseptor  $\beta_3$ -adrenergik 2.0%, Hasil ujian statistik mendapati kesemua polimorfisma gen tidak berhubung secara signifikan/bererti dengan insiden diabetes jenis 2 pada masyarakat Melayu Kelantan ( $p < 0.05$ ).

## **Kesimpulan**

Kesemua jenis polimorfisma yang dikaji tidak menjadi penyumbang utama dalam patogenesis diabetes jenis 2 bagi masyarakat Melayu Kelantan. Kajian perlu diteruskan dengan penyelidikan terhadap polimorfisma lain pada gen-gen yang sama dan juga pada gen-gen lain yang pernah dilaporkan terlibat dalam patogenesis diabetes jenis 2 pada populasi lain.

## **Senarai kata kunci:**

*Polimorfisma, gen, reseptor Leptin, reseptor Glukokortikoid, reseptor  $\beta_3$ -adrenergik dan Faktor Nekrosis Tumor alfa (Tnf- $\alpha$ ),*

***ANALYSIS OF LEPTIN RECEPTOR, GLUCOCORTICOID RECEPTOR,  $\beta_3$ -ADRENERGIC RECEPTOR, TUMOUR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNF- $\alpha$ ) GENE POLYMORPHISM IN TYPE 2 DIABETES MELLITUS IN KELANTAN MALAYS.***

**ABSTRACT**

Diabetes is a complex disease with both genetics and environmental component in the pathogenesis. Progress in the human genetic has allowed a better understanding in the search for either specific or multiple affliction of the candidate gene susceptible for the disease. Since the past 3 years studies showed that several genes including the Leptin receptor,  $\beta_3$ -adrenergic receptor, Tumour necrosis factor alpha (Tnf- $\alpha$ ) and Glucocorticoid receptor have been linked and their polymorphism associated to diabetes. However, the prevalence involvement and polymorphic variations differ markedly among the ethnic groups. In this initial project the choice of these candidate genes markers were selected from the biological pathway likely to the development and the progression of the NIDDM. Future research will include other known and related gene susceptible to the disease. The potential role of identification of these variant not only contribute to better understanding of the pathogenesis of the disease but it also provide a research tool for the studies to assess the association of the multiple genetics markers with the disease.

We expect to define the association of these genes polymorphism to the pathogenesis of diabetes in the local population.

**Research Methodology**

*Subject and control* 50 patients clinically confirm as diabetes and attending the Diabetes Clinics in the HUSM were selected. The clinical characteristics including sex, age, body mass index, blood pressure measurements and biochemical analysis of HbA1c and fasting blood sugar were analyzed. 50 controls are normal individual who do not have diabetes. A total 10 ml blood were collected

in the EDTA container from each patients and normal individual for DNA extraction and further genetic analysis.

*Genetic determination* Genomic DNA was extracted from the above sample using standard non-phenol extraction procedure. The genomic DNA were amplified using specific primers and polymerase chain reaction (PCR) conditions for each specific gene of interest according to published works with modification. The Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) was applied for mutation analysis. Both PCR and RFLP products were subjected to electrophoresis on either agarose or polyacrylamide gel for allele identifications.

*Statistical analysis* The chi-square test was carried out for comparison of the genotype frequency and level of the variable between the genotype groups was compared using analysis of variance (ANOVA). *P* values of less than 0.05 were considered as statistically significant.

## **Results**

From the whole sample studied, genotype frequency for mutant allele in these four genes are ranging from 8.0% to 29.2%. The highest genotype frequency for mutant allele is the Pentanucleotide Insertion/Deletion Polymorphism of the 3'-UTR of Leptin receptor gene (17.0%), followed by Trp<sup>64</sup>Arg polymorphism of the  $\beta_3$ -adrenergic receptor gene (10.0%), followed by Asn<sup>363</sup>Ser polymorphism of the Glucocorticoid receptor gene (4.0%) and the lowest is G<sup>-308</sup>A polymorphism of the Tumour necrosis factor alpha (Tnf- $\alpha$ ) gene (3.0%). While in normal control samples, the result shows genotype frequency for mutant genes are 16.0% (Lepr), 7.0% (Tnf- $\alpha$ ), 3.0% (GRL) and 2.0% ( $\beta_3$ -AR). All genes are not associated with the incidence of type 2 diabetes in Kelantan Malay subjects ( $p < 0.05$ ).

## **Conclusion**

We suggested that all genes are not likely to be the major predispose in the incidence of type 2 diabetes in Kelantan Malay population except for  $\beta_3$ -adrenergic receptor gene. Future studies should be done to screen for other polymorphism in same genes and also in other genes which have been reported in other populations to have significant association with the pathogenesis of type 2 diabetes.

## **Keywords:**

*Polymorphism, gene, Leptin receptor,  $\beta_3$ -adrenergic receptor, Tumour Necrosis Factor alpha (Tnf- $\alpha$ ) and Glucocorticoid receptor*



(b) Senaraikan Kata Kunci yang digunakan di dalam abstrak:

<u>Bahasa Malaysia</u>	<u>Bahasa Inggeris</u>
..... Polimorfisma	..... Polymorphism
..... gen	..... gene
..... reseptor Leptin	..... Leptin receptor
..... reseptor Glukokortikoid	..... Glucocorticoid receptor
..... reseptor $\beta_3$ -adrenergik	..... $\beta_3$ -adrenergic receptor
..... Faktor Nekrosis Tumor alfa (Tnf- $\alpha$ )	..... Tumour Necrosis Factor alpha (Tnf- $\alpha$ )

1) **First Asean Conference On Medical Sciences, Kota Bharu, Kelantan – 18-21 May 2001**

*(Poster Presentation: Analysis of Trp64Arg polymorphism of the  $\beta_3$ -adrenergic Receptor Gene in Diabetes Mellitus type II in Kelantan Malay subject.*

S. I. T. Othman<sup>1</sup>, M. N. Isa<sup>1</sup>, A. A. Ismail<sup>2</sup>, M. Mafauzy<sup>3</sup>, M.R. Sidek<sup>1</sup>, S.F., Ramli<sup>1</sup>, N.A. Adam<sup>1</sup>)

**2) Malaysian Science and Technology Congress 2001, Kota Kinabalu, Sabah – 23-26 September 2001**

(Oral Presentation : *Trp<sup>64</sup>Arg Polymorphism of the  $\beta_3$ -adrenergic Receptor Gene Is Not Associated with the Incidence of Diabetes Mellitus Type II in Kelantan Malay Subjects.*

M. N. Isa<sup>1</sup>, S. I. T. Othman<sup>1</sup>, A. A. Ismail<sup>2</sup>, M. Mafauzy<sup>3</sup>, M.R. Sidek<sup>1</sup>, S.F., Ramli<sup>1</sup>.

**3) Proceeding of Malaysian Science and Technology Congress 2001 (COSTAM), Sabah 2001.**

*Trp64Arg Polymorphism of the  $\beta_3$ -adrenergic Receptor Gene Is Not Associated with the Incidence of Diabetes Mellitus Type II in Kelantan Malay Subjects.*

M. N. Isa<sup>1</sup>, S. I. T. Othman<sup>1</sup>, A. A. Ismail<sup>2</sup>, M. Mafauzy<sup>3</sup>, M.R. Sidek<sup>1</sup>, S.F., Ramli<sup>1</sup>.

**4) 13<sup>th</sup> National Biotechnology Conference, Penang - 11-13 November 2001**

(Oral presentation: *Preliminary Study of NcoI Polymorphism of the TNF- $\alpha$  Gene with the Incidence of Type 2 Diabetes Mellitus in Kelantan Malay Subjects.*

S. I. T. Othman<sup>1</sup>, A. A. Ismail<sup>2</sup>, M. Mafauzy<sup>3</sup>, M. Ros Sidek<sup>1</sup>, S.F., Ramli<sup>1</sup>, M. N. Isa<sup>1</sup>.

**5) Proceeding of 13<sup>th</sup> National Biotechnology Conference, Penang 2001**

*Preliminary Study of NcoI Polymorphism of the TNF- $\alpha$  Gene with the Incidence of Type 2 Diabetes Mellitus in Kelantan Malay Subjects.*

S. I. T. Othman<sup>1</sup>, A. A. Ismail<sup>2</sup>, M. Mafauzy<sup>3</sup>, M. Ros Sidek<sup>1</sup>, S.F., Ramli<sup>1</sup>, M. N. Isa<sup>1</sup>.

**6) 17<sup>th</sup> National Conference on Medical Sciences 2002, Kota Bharu, Kelantan – 17 & 18<sup>th</sup> May 2002**

*(Oral presentation: Analysis of Pentanucleotide Polymorphism of the 3'-UTR of the Leptin Receptor Gene with the Incidence of Type 2 Diabetes in Kelantan Malays).*

S. I. T. Othman<sup>1</sup>, A. A. Ismail<sup>2</sup>, M. Mafauzy<sup>3</sup>, M.R. Sidek<sup>1</sup>, S.F., Ramli<sup>1</sup>, M. N. Isa<sup>1</sup>

**7) 27<sup>th</sup> Annual Conference of the MSBMB 2002, Pan Pacific Hotel, Kuala Lumpur - 7 November 2002**

*(Poster presentation: Modified method for Pentanucleotide insertion/deletion polymorphism of the 3'-UTR of the LEPR gene analysis)*

S. I. T. Othman<sup>1</sup>, A. A. Ismail<sup>2</sup>, M.R. Sidek<sup>1</sup>, S.F., Ramli<sup>1</sup>, M. N. Isa<sup>3</sup>

**8) 4<sup>th</sup> HUGO Pacific Meeting & 5<sup>th</sup> Asia-Pacific Conference on Human Genetics, Ambassador City Jomtien, Pattaya, Colburi, Thailand - 27-30 Oktober 2002**

(Poster presentation: The pattern of mutant genotype in type 2 Diabetes in Kelantan Malays)

S. I. T. Othman <sup>1</sup>, A. A. Ismail <sup>2</sup>, M.R. Sidek <sup>1</sup>, S.F., Ramli <sup>1</sup>, SB Ismail<sup>4</sup>, M. N. Isa <sup>3</sup>

(b) **Faedah-Faedah Lain Seperti Perkembangan Produk,  
Prospek Komersialisasi Dan Pendaftaran Paten.**  
*(Jika ada dan jika perlu, sila gunakan kertas berasingan)*

**Tiada**

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

(c) **Latihan Gunatenaga Manusia**

i) **Pelajar Siswazah** **Sharifah Izwan Bt. Tuan Othman** .....

.....  
.....  
.....

ii) **Pelajar Prasiswazah:** .....

.....  
.....  
.....

iii) **Lain-Lain :** .....

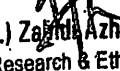
.....  
.....  
.....

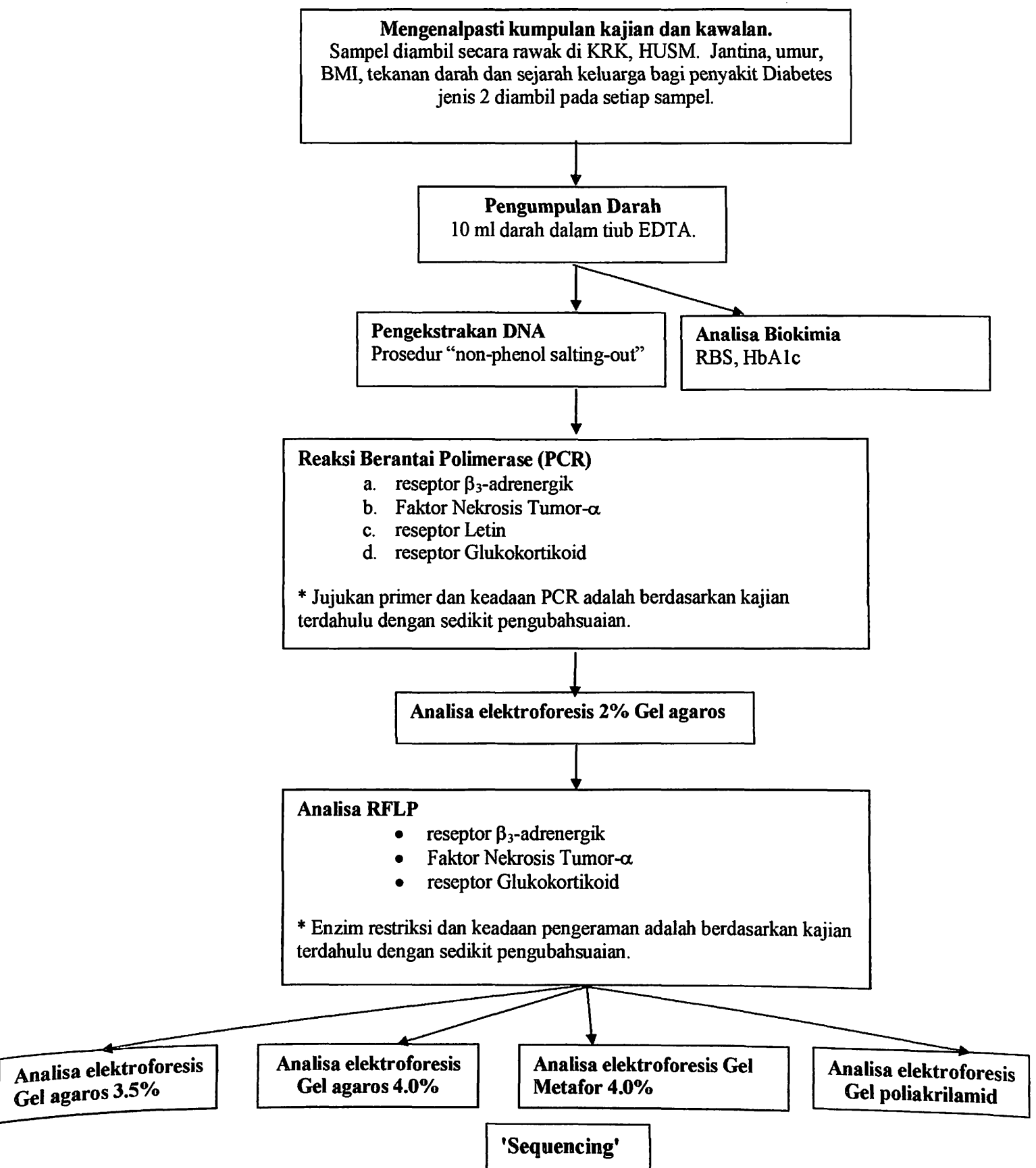
6. Peralatan Yang Telah Dibeli:

Tiada

---

UNTUK KEGUNAAN JAWATANKUASA PENYELIDIKAN UNIVERSITI

  
Assoc. Prof. (Dr.) Zaidi Azhar Mohd. Hussin  
Chairman of Research & Ethics Committee  
TANDATANGAN PENYELIDIKAN  
SCHOOL OF MEDICINE  
JAWATANKUASA PENYELIDIKAN  
PUSAT PENGAJIAN  
Universiti Sains Malaysia  
16150 Kubang Kerian  
KELANTAN, MALAYSIA.



**Rajah 1** Carta alir kaedah kajian polimorfisma gen-gen dalam diabetes jenis 2 di kalangan Melayu di Kelantan.

## Item yang telah Dibeli melalui Peruntukan Projek

**Nama projek:** Analysis of  $\beta_3$ -adrenergic receptor, Leptin receptor, Tumour Necrosis Factor-alpha and Glucocorticoid receptor gene polymorphism in type 2 Diabetes patients in Kelantan Malays.

**No akaun:** 304/PPSP/6131125

**Peruntukan geran:** RM 16 800

**Tempoh geran:** 11/2 tahun (2000- Februari 2002)

Tarikh pembelian	Item	Nama pembekal
Jun 2000	10 % Cagaran	-
25.9.2000	Reagen PCR	BST
25.9.2000	Primer gen LEPR & $\beta_3$ -AR	RBL
13.1.2001	Mval	BST
26.5.2001	Primer gen LEPR & $\beta_3$ AR	RBL
26.5.2001	Reagen PCR gen Lepr, Tnf-a	RBL
26.5.2001	Reagen PCR gen Lepr, Tnf-a, GRL	BST
26.5.2001	Primer gen Tnf-a & GRL	RBL
26.5.2001	Filem Polaroid	MediGene



<b>Tarikh</b>	<b>Item</b>	<b>Nama pembekal</b>
Jan 2001	Wang pendahuluan (panjar)	-
Jan 2001	Wang Honorarium	-
Mei 2001	Wang Pendaftaran Seminar ACMS	-
Ogos 2001	Taq Polymerase	BST
November 2001	Wang Pendaftaran Seminar 13 <sup>th</sup> National Biotechnology	-
Disember 2001	DNA sequencing	RBL
Januari 2002	DNA sequencing	BST
Februari 2002	Reagen	BST, RBL, RI

**Laporan Komprehensif Penyelidikan**

**Analisa Polimorfisma Gen-gen Reseptor Leptin, Reseptor  
Glukokortikoid, Reseptor  $\beta_3$ -adrenergik dan Faktor Nekrosis Tumor-  
alfa Pada Pesakit Diabetes Jenis 2 di Kalangan Melayu di Kelantan.**

**304/PPSP/6131125**

**Disediakan oleh:**

***Sharifah Izwan Bt. Tuan Othman***

**Pusat Genom Manusia,  
Pusat Pengajian Sains Perubatan, Kampus Kesihatan  
16150 Kubang Kerian, Kelantan**

**Di bawah seliaan:**

***Profesor Mohd. Nizam B. Isa***

**Universiti Perubatan Malaysia,  
Sesama Center, Plaza Komanwel, Bukit Jalil,  
57000 Sri Petaling, Kuala Lumpur**

***Prof. Madya Dr. Abd. Aziz al-Safi B. Ismail***

**Jabatan Perubatan Masyarakat,  
Pusat Pengajian Sains Perubatan, Kampus Kesihatan  
16150 Kubang Kerian, Kelantan**

***Profesor Mafauzy B. Mohamed***

**Jabatan Perubatan,  
Pusat Pengajian Sains Perubatan, Kampus Kesihatan  
16150 Kubang Kerian, Kelantan**

## Pengenalan

Diabetes Jenis 2 adalah sejenis penyakit kompleks yang melibatkan pelbagai faktor seperti faktor genetik, persekitaran dan gaya hidup seseorang. Ia adalah kecacatan metabolik yang kronik dan kecacatan heterogenus secara genetik (Elbin *et al.* 1994). Pesakit yang kebanyakannya orang dewasa, biasanya obes dan mengalami koresistenan insulin. Pesakit mengalami hiperinsulinemia akibat koresistenan atau kecacatan insulin. Keadaan hiperinsulinemia berlaku akibat hati dan otot rangka tidak dapat menyimpan glukos dan pada masa yang sama juga tisu tubuh tidak dapat menggunakan glukos. Akibatnya glukos berkumpul dengan banyaknya dalam darah dan memberi kesan buruk kepada tubuh terutamanya buah pinggang, sistem vaskular, mata dan sistem saraf pusat serta periferi (Mohamed & Osman. 1998). Komplikasi daripada penyakit ini sering memberi kesan mortaliti dan morbiditi kepada pesakit. Komplikasi diabetes jenis 2 mengikut organ-organ penting tubuh ditunjukkan dalam Jadual 1.

Perkembangan bidang genetik manusia khususnya di Malaysia amat memberi faedah kepada pesakit diabetes jenis 2 tempatan memandangkan terdapatnya penemuan polimorfisma dalam pelbagai gen yang sering dikaitkan dengan diabetes. Kajian-kajian yang telah dibuat melibatkan beberapa populasi di serata dunia termasuklah Jepun (Azuma *et al.* 1998), Itali (Romeo *et al.* 2001), Finland (Rissanen *et al.* 1997), Perancis (Herrmann *et al.* 1998) dan Pima Indians (Walston *et al.* 1995). Walau bagaimanapun terdapat variasi di antara populasi-populasi tersebut dan ini menyebabkan kajian seperti ini amatlah penting dilakukan pada pesakit tempatan agar kita dapat memahami dengan lebih jelas corak patogenesis diabetes jenis 2 setempat.

**Jadual 1** Kompilaksi-komplikasi yang sering berlaku pada pesakit diabetes jenis 2 mengikut organ-organ sasaran.

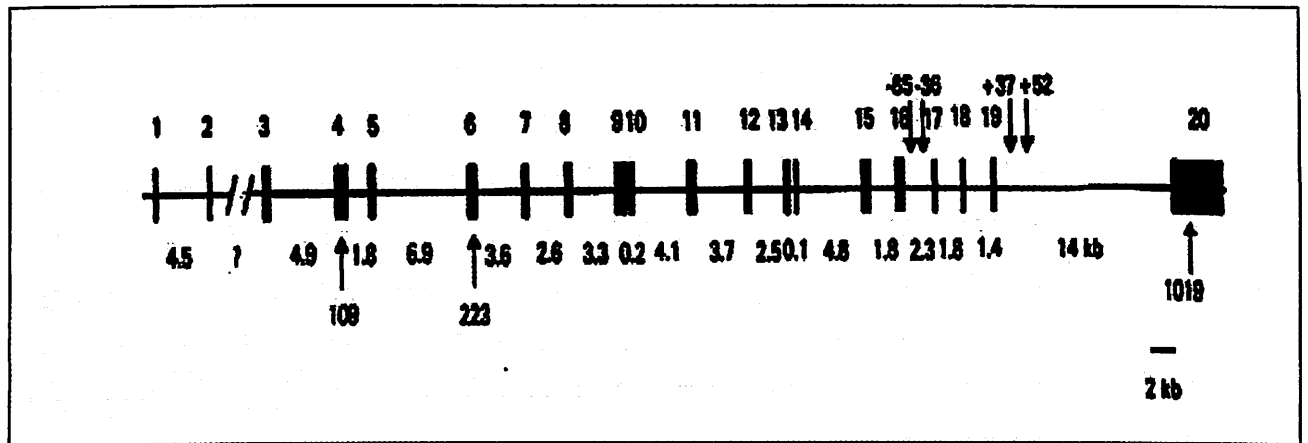
<i>Organ</i>	<i>Komplikasi</i>
1. Ginjal	Kerosakan ginjal Glomerular Mikroangiopati Infeksi kencing Glikogen nefrosis (Lesi Armanni-Enstein)
2. Mata	Gangguan penglihatan Retinopati Glukoma Poliserasi retinopati Katarak Infeksi
3. Sistem saraf	Strok Neuropati periferi Kematian
4. Kulit	Gangren Infeksi Nekrobiosis lipoidika diabetorum Kulit kering (Xantoma)
5. Sistem kardiovaskular	Infarksi miokardium Arteriosklerosis Kematian
6. Sistem pembiakan	Bayi mati sebelum dilahirkan Impotensi
7. Umum	Luka lambat sembuh Pesakit amat mudah terinfeksi

(Chandrasoma & Clive. 1995)

Terdapat sembilan jenis polimorfisma yang sering berlaku di bahagian ekson dan intron dalam gen LEPR seperti yang ditunjukkan dalam Jadual 2. Lima *hot spot* terdapat dalam kawasan mengkod (*coding region*) dan 4 *hot spot* terdapat dalam kawasan tak-terjemah (*non-coding region*) (Oksanen *et al.* 1998). Mutasi-mutasi ini akan menurunkan respon insulin secara akut dan menyebabkan penurunan sensitiviti insulin dan akhirnya menjadi penyebab diabetes jenis 2.

Dalam kajian ini, penumpuan diberikan hanya kepada satu *hot spot* bagi gen LEPR iaitu pada kawasan 3'-tak terjemah (3'-UTR) yang melibatkan polimorfisma penyelitan/delesi pentanukleotida dalam struktur gen reseptor leptin. Ini akan menyebabkan berlakunya anjakan rangka bagi jujukan DNA gen LEPR yang memberi kesan kepada struktur mRNA yang dihasilkan selepas proses transkripsi. Penyisipan yang berlaku biasanya melibatkan jujukan CTTTA yang mana akan ditranskripsi kepada GUUUT dalam jujukan mRNA reseptor. Kehadiran jujukan ini menyebabkan terhasilnya struktur *stem-loop* yang terbentuk daripada 10 nukleotida bagi struktur *loop* dan 8 nukleotida yang berkompemantari bagi struktur *stem* (Gambarfoto 2). Struktur ini juga pernah diperhatikan wujud dalam mRNA lain seperti histon, reseptor transferin, faktor pertumbuhan *insulin-like II* serta sitokin-sitokin. Struktur ini dipercayai mempunyai afiniti yang tinggi untuk bergabung dengan protein regulatori yang akan mengganggu kadar degradasi dan/atau translasi mRNA ini (Brown *et al.* 1996).

Struktur *stem-loop* yang terdiri daripada beberapa salinan yang kaya jujukan A-U ini membentuk elemen pentastabilan A+U (AUDE) yang bertindak mengganggu kestabilan struktur mRNA pelbagai protein (Ross. 1995). Kedua-dua faktor (struktur *stem-loop* dan elemen AUDE) inilah yang akan menyebabkan kecacatan fungsi reseptor leptin dan ini menjadi penyebab hiperinsulinemia yang berlaku. Seterusnya keresistenan insulin berlaku dan menjadi punca insiden diabetes jenis 2.



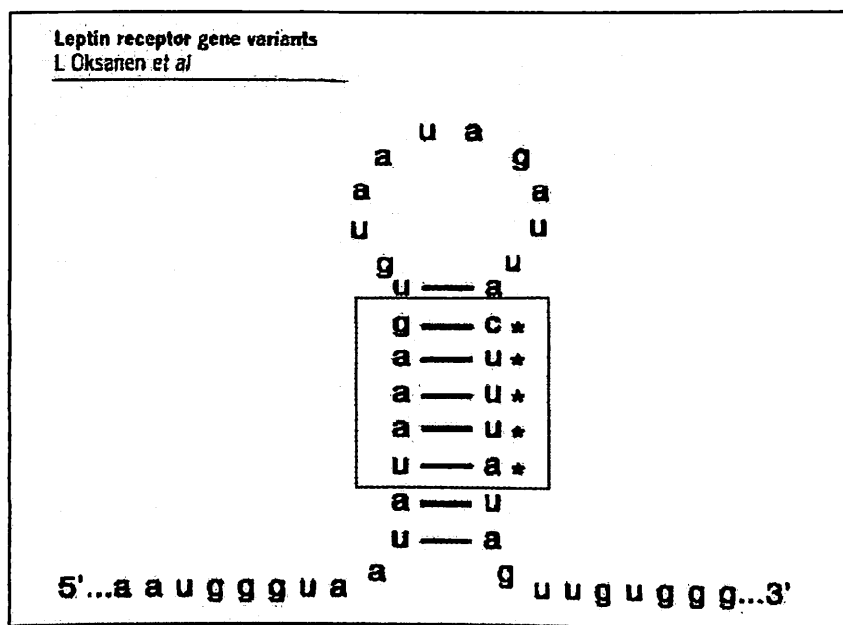
**Gambarfoto 1** Struktur gen reseptor Leptin

Terdapat pelbagai mutasi gen yang dikaitkan dengan perkembangan diabetes jenis 2, termasuk **gen reseptor leptin** (Cioffi *et al.* 1996), **reseptor  $\beta_3$ -adrenergik** (Elisabeth *et al.* 1995), **reseptor glukokortikoid** (Kopper *et al.* 1997) dan **Faktor Tumor Nekrosis- $\alpha$**  (Fernandez-Real *et al.* 1997). Leptin merupakan hormon yang dihasilkan daripada tisu adipos terutamanya oleh tisu lemak putih dalam tubuh (Auwerx & Staels. 1998). Aras hormon Leptin dalam serum menandakan jumlah tenaga yang tersimpan dalam tisu adipos (Uragoda, 2001). Ia mempunyai fungsi yang pelbagai dan yang paling utama adalah dalam pengawalan berat tubuh, kelancaran fungsi neuroendokrin dan pengawalaturan pengambilan dan penggunaan tenaga (Cohen *et al.* 1996) serta terlibat dalam kematangan seksual individu dan merangsang sekresi hormon tirotrifin dan hormon pertumbuhan (Clement *et al.* 1998). Hormon leptin mula ditemui pada tahun 1994 oleh Zhang dan rakan-rakan dan bermula daripada tarikh tersebut terdapat banyak kajian dilakukan bagi menunjukkan kepentingan hormon ini terutamanya dalam insiden obesiti dan Diabetes Mellitus (Pelleymounter *et al.* 1995, Sivitz *et al.* 1997). Hasil daripada kajian-kajian tersebut didapati bahawa leptin dapat bertindak sebagai rawatan anti-obesiti dan rawatan diabetes terutama kepada individu yang mempunyai serum leptin yang rendah (Friedman. 1997).

Leptin bertindak sebagai adipostat yang akan memberi isyarat pada tubuh mengenai status simpanan tenaga dalam tisu adipos melalui reseptor leptin (LEPR) (Mizuno *et al.* 1996). Ia ditemui oleh Tartaglia dan rakan-rakan pada tahun 1995. Reseptor leptin merupakan ahli keluarga reseptor sitokin kelas I dan ia dikodkan oleh gen LEPR yang terletak di kawasan 1p31 yang terletak di antara penanda mikrosatelit D1S515 dan ~1.5Mb telomerik daripada D1S198. Struktur genom gen ini menjangkau ~70kbp (pasangan bes) dan mempunyai 20 exon (Thompson *et al.* 1997) (Gambarfoto 1). Gen LEPR mempunyai hubungan yang rapat dengan sekresi hormon insulin kerana kedudukannya yang berhampiran dengan penanda mikrosatelit D1S198. Reseptor leptin diekspresi di pelbagai tisu seperti otak (Considine *et al.* 1996), sel  $\beta$ -pankreas, hati (Kieffer *et al.* 1996), otot rangka, sel ovari dan sel stem haematopoetik (Cioffi *et al.* 1996). Dalam sel  $\beta$ -pankreas, LEPR bertindak sebagai perantara dalam perencatan insulin melalui peningkatan aras leptin dalam darah.

**Jadual 2** Jenis mutasi yang terdapat dalam gen LEPR.

Bahagian gen	Kedudukan mutasi	Mutasi	Jenis mutasi
<i>Coding region</i>	Ekson 2	Lys190Arg	mutasi <i>missense</i>
	Ekson 4	Lys656Asn	mutasi <i>missense</i>
	Ekson 13	Leu715	mutasi senyap
	Ekson 14	Gln223Arg	mutasi <i>missense</i>
	Ekson 18	Pro1019	mutasi senyap
<i>Non-coding region</i>	Intron 17	kedudukan ke-20, 31, 37	mutasi senyap
	Kawasan tak terjemah- 3' (3'-UTR)	delesi/penyisipan pentanukleotida	anjakan rangka



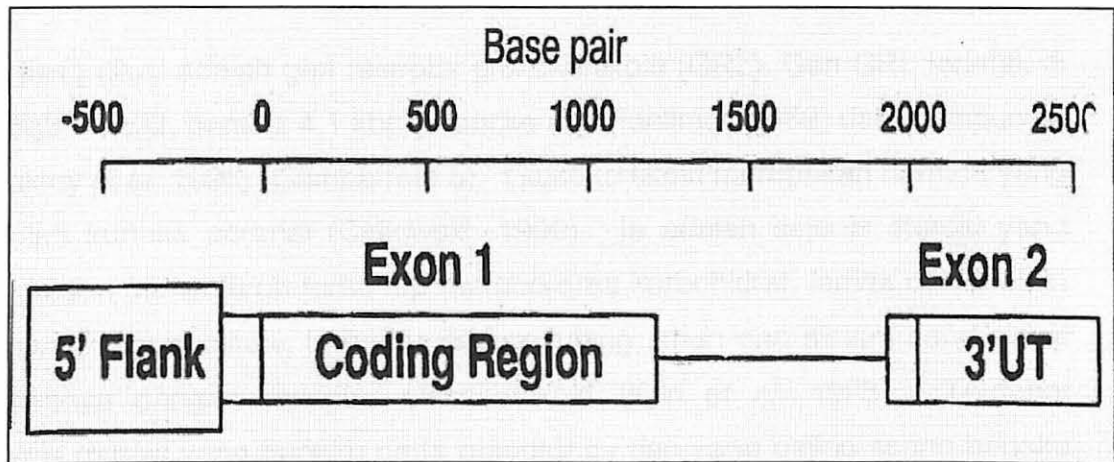
**Gambarfoto 2** Struktur *stem-loop* yang terbentuk akibat penyisipan GAAAU yang berkomplesi dengan CUUUA (ditandakan dengan bintang) dalam jujukan mRNA reseptor leptin.



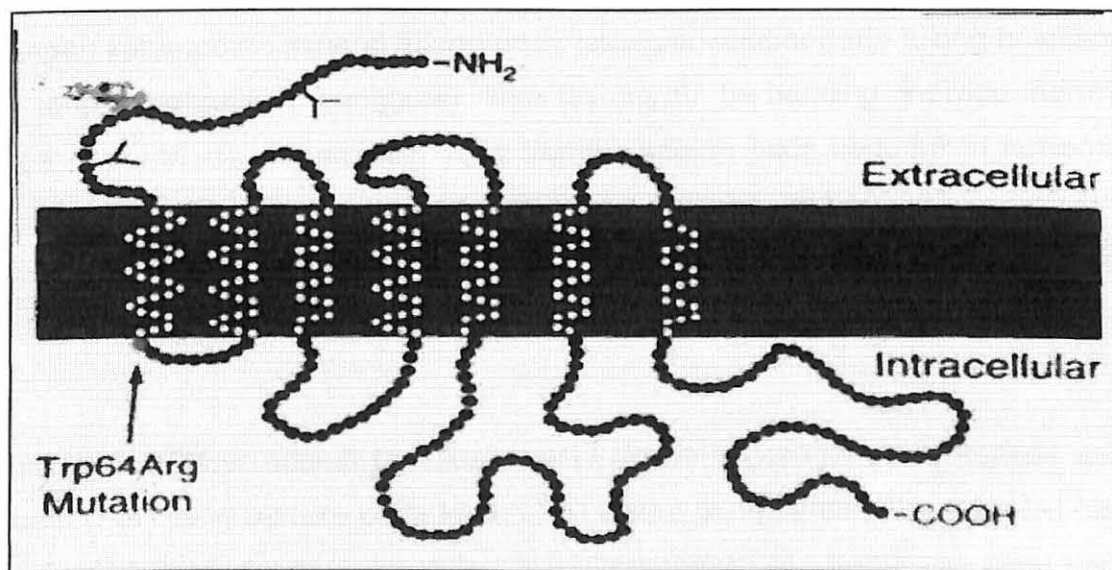
Gen kedua yang dikaji dalam penyelidikan ini adalah gen reseptor  $\beta_3$ -adrenergik ( $\beta_3$ -AR). Ia terletak pada kromosom 8p11.2 - p12 dan bersaiz ~8kbp (Emorin *et al.* 1989). Gen  $\beta_3$ -AR mempunyai 2 ekson (Gambarfoto 3). Gen ini berfungsi mengkodkan reseptor  $\beta_3$ -adrenergik.  $\beta_3$ -AR diekspresi dalam tisu adipos dalam tisu visera (Emorin *et al.* 1989). Secara fisiologi,  $\beta_3$ -AR bertindakbalas memperantara lipolisis melalui ransangan katekolamin, meningkatkan pengangkutan asid lemak bebas ke vena portal dan secara langsung bertindak mengawalatur penggunaan tenaga dan berat tubuh seseorang (Motoyama *et al.* 1997).

Mutasi pada  $\beta_3$ -AR akan menyebabkan sindrom keresistenan insulin, obesiti dan penyakit jantung koronari. Faktor-faktor ini merupakan peransang utama diabetes jenis 2. Hal ini berlaku kerana apabila tubuh secara kronik telah menghadapi kemasukan lemak yang banyak dalam otot, maka banyak asid lemak bebas tersedia bagi sintesis VLDL dalam hati. Maka komposisi lemak di membran otot-rangka berubah dan meningkatkan kepekatan trigliserid dalam otot. Bagi mengawalatur keadaan ini, tubuh akan mengurangkan serapan asid lemak bebas secara meningkatkan keresistenan insulin dalam otot rangka. Mutasi yang paling kerap dikenalpasti pada gen  $\beta_3$ -AR adalah Trp<sup>64</sup>Arg. Mutasi lain yang pernah dilaporkan adalah G<sup>1856</sup>T (kawasan intron) dan G<sup>3139</sup>C (kawasan berdekatan dengan 3'-UTR), namun jarang ianya dilaporkan (Azuma *et al.* 1998).

Dalam kajian ini polimorfisma yang dikaji adalah polimorfisma Trp<sup>64</sup>Arg yang mana berlaku penggantian bes Guanin oleh Sitosin di kedudukan nukleotid 192. Penggantian ini akan menyebabkan perubahan asid amino Triptofan (Trp) kepada Arginin (Arg) pada kodon 64. Variasi ini berlaku pada *loop* pertama reseptor ini (Gambarfoto 4). Bahagian protein ini sangat penting dalam memastikan fungsi normal reseptor  $\beta_3$ -AR. Kewujudan arginin dalam struktur polipeptida  $\beta_3$ -AR akan menyebabkan  $\beta_3$ -AR tidak dapat bergerak ke permukaan sel dan menghalang gabungan  $\beta_3$ -adrenergik-reseptor  $\beta_3$ -adrenergik berganding dengan sistem efektor intraselular (Walston *et al.* 1995).



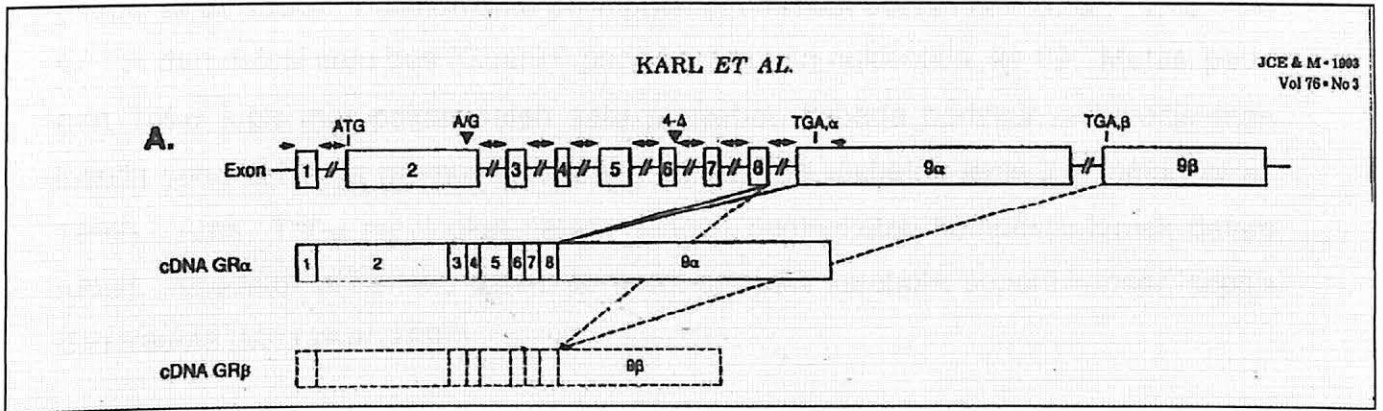
**Gambarfoto 3** Struktur gen reseptor  $\beta_3$ -adrenergik



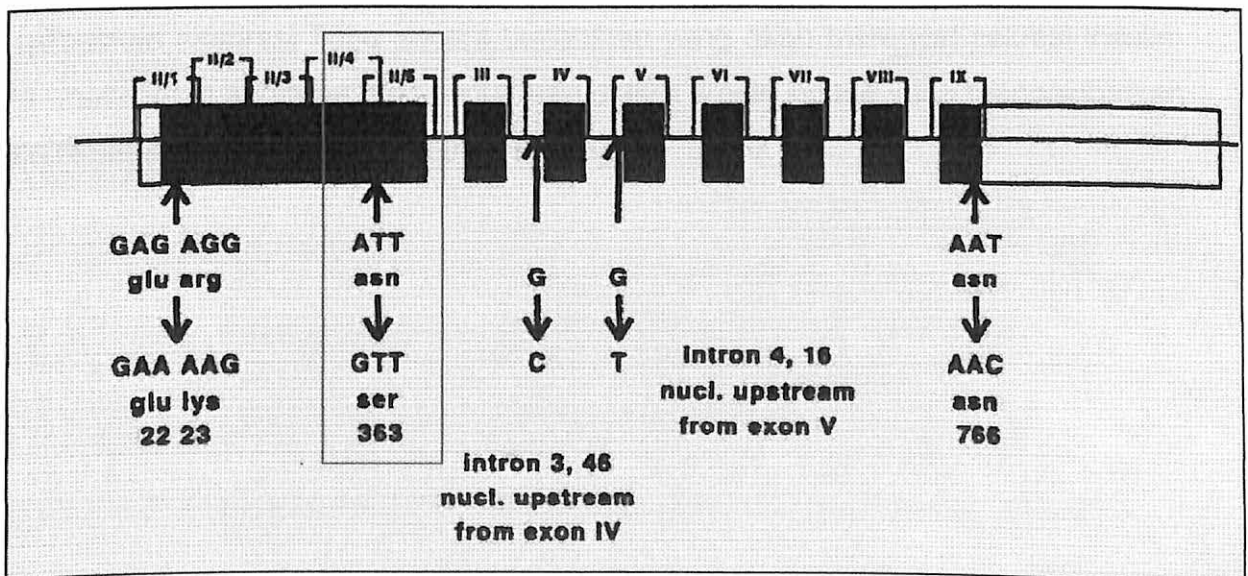
**Gambarfoto 4** Struktur reseptor  $\beta_3$ -adrenergik yang menunjukkan bahagian ekstraselular dan intraselular. Setiap asid amino ditunjukkan dengan bulatan-bulatan kecil. Polimorfisma Trp<sup>64</sup>Arg (bulat berwarna merah) terletak dalam permulaan *loop* pertama bahagian intraselular reseptor

Gen ketiga yang dikaji adalah gen reseptor glukokortikoid (GRL). Gen GRL terletak di kromosom 5q31 – q32, bersaiz 4.1 kbp (Francke and Foellmer. 1989) dan mempunyai 9 ekson (Oakley *et al.* 1996) (Gambarfoto 5). Glukokortikoid merupakan hormon yang dihasilkan oleh korteks adrenal (Cidlowski. 1999). Ia adalah sejenis steroid yang mempunyai kesan menyeluruh terhadap metabolisme karbohidrat, lemak dan protein serta pengawalan homeostatik terhadap sistem tulang, imun dan sistem saraf pusat melalui ikatannya dengan reseptor glukokortikoid (Karl *et al.* 1993). Terdapat beberapa jenis mutasi yang berlaku pada reseptor ini dan yang paling sering berlaku pada gen GRL adalah Asn<sup>363</sup>Ser yang menyebabkan perubahan sensitiviti glukokortikoid (Dobson *et al.* 2001). Huizenga dan rakan-rakan (1998) melaporkan bahawa individu yang mempunyai alel 363Ser lebih sensitif terhadap glukokortikoid eksogenous berbanding individu yang mempunyai alel 363Asn. Kesan jangka panjang pada individu 363Ser adalah mereka mungkin menghadapi peningkatan BMI dan pengurangan ketumpatan mineral tulang pada bahagian lumbar pada tulang belakang mereka tanpa mengalami gangguan tekanan darah berbanding individu normal (Huizenga *et al.* 1998). Mutasi lain yang berlaku adalah pada kedudukan nukleotid ke-2054 yang menyebabkan penukaran asid amino Valin ke Asid Aspartik, variasi G/T pada intron 4, pananda mikrosatelit D5S207 dan polimorfisma BclI yang berlaku di intron 1 dan intron 2 (Kopper *et al.* 1997).

Polimorfisma Asn<sup>363</sup>Ser adalah pertukaran asid amino asparagin (Asn) kepada asid amino serin (Ser) yang berlaku pada kodon 363 akibat penggantian Adenosin (A) oleh Guanin (G) pada kedudukan nukleotida 1218 (Gambarfoto 6). Kehadiran serin pada jujukan polipeptida reseptor glukokortikoid akan menyebabkan fosforilasi molekul tersebut. Ini berlaku dalam kawasan modulator gen GRL yang akhirnya akan menyebabkan peningkatan transaktivasi reseptor glukokortikoid. Peningkatan ini menyebabkan berlakunya peningkatan sensitiviti hormon glukokortikoid secara berlebihan yang merangsang kepada perkembangan obesiti, kecacatan metabolisme dan diabetes jenis 2 (Lin & Moris. 1999).



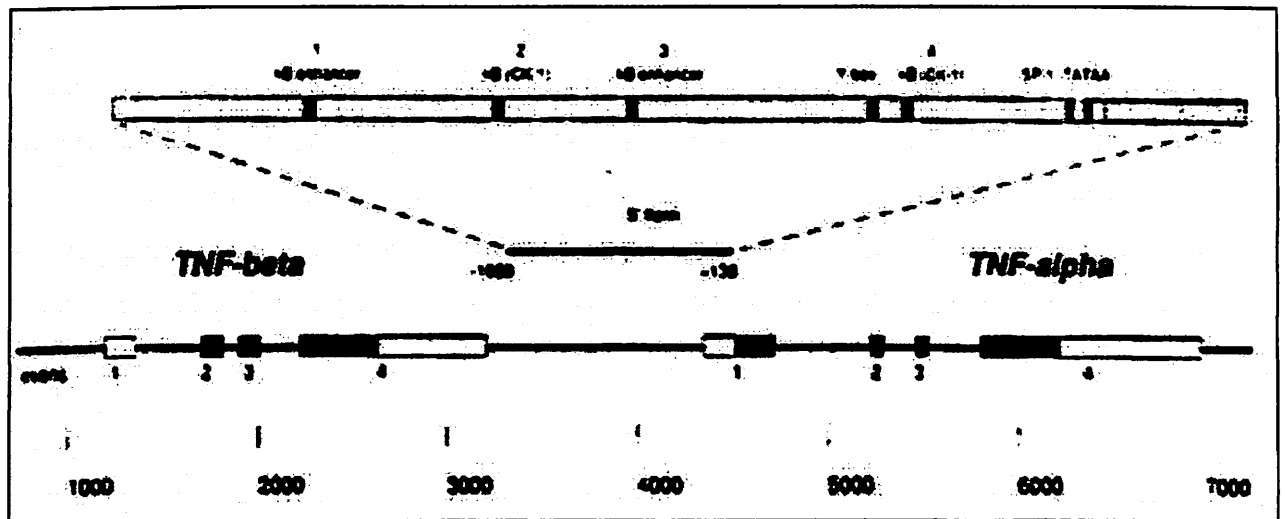
**Gambarfoto 5** Struktur gen reseptor glukokortikoid. Gen ini mengandung sembilan ekson yang mana terdapat *isoform* pada ekson ke-9.



**Gambarfoto 6** Struktur genomik bagi gen reseptor glukokortikoid yang menunjukkan kedudukan dan keadaan polimorfisma yang dapat diperhatikan. *Hot spot* yang dikaji dalam penyelidikan ini ditandakan dalam kotak merah. Diagram struktur gen tidak dilukis mengikut skala (Karl *et al.* 1993).

Gen Faktor Tumor Nekrosis- $\alpha$  (Tnf- $\alpha$ ) terletak pada kromosom 6p21.1 – p21.3 dan mempunyai 4 ekson (Nedwin *et al.* 1985) (Gambarfoto 7). Terdapat beberapa polimorfisma gen Tnf- $\alpha$  telah dilaporkan terlibat dengan penyakit-penyakit seperti sklerosis tersebar, rheumatoid arthritis, sistemik lupus eritematus (SLE), keadaan klinikal AIDS, serebral malaria (McGuire *et al.* 1994) dan infeksi meningiokokal (Nadel *et al.* 1996). Polimorfisma-polimorfisma tersebut adalah C<sup>-857</sup>A, C<sup>-851</sup>T, G<sup>-308</sup>A, G<sup>-238</sup>A dan delesi satu bes (Guanin) pada kedudukan nukleotida ke-69. Mutasi pada gen Tnf- $\alpha$  juga merupakan salah satu penyebab kepada berlakunya keresistenan insulin yang akhirnya membawa kepada berlakunya diabetes jenis 2 (Zinman *et al.* 1999). Aras Tnf- $\alpha$  meningkat setara dengan peningkatan komposisi lemak dalam tubuh. Keadaan ini berlaku dalam penyakit-penyakit katabolik seperti kanser, sepsis dan trauma (Mira *et al.* 1999).

Dalam kajian ini analisa yang dilakukan terhadap gen Tnf- $\alpha$  adalah pada *hot spot* -308 yang terletak dalam kawasan promoter yang mana berlaku penggantian bes Guanin oleh Adenin. Mutasi *missense* ini bertindak sebagai pengaktif transkripsi yang poten yang akan menyebabkan peningkatan aktivasi transkripsi gen Tnf- $\alpha$  dan ini menyebabkan ekspresi Tnf- $\alpha$  secara berlebihan yang akan merencat sekresi insulin. Pada masa yang sama berlaku penurunan aktiviti tirosin kinase yang mengakibatkan kesan resistan insulin dan obesiti (Herrmann *et al.* 1998).



Gambarfoto 7 Struktur gen Faktor Tumor Nekrosis- $\alpha$

## **Kepentingan kajian:**

Kajian ini amat penting dilakukan memandangkan prevalens dan insiden penyakit diabetes jenis 2 adalah tinggi di Malaysia. Kajian ini berfungsi membantu diagnosis penyakit diabetes jenis 2 dengan tepat dan cepat melalui penelitian jujukan DNA sesuatu gen. Maka keterukan penyakit dapat dikawal dengan mudah dan insiden penyakit dapat dielakkan daripada berlaku terhadap ahli keluarga yang rentan secara genetik.

Melalui kajian ini juga diharap dapat membantu perkembangan terapi diabetes jenis 2 di Malaysia agar pesakit dapat menikmati rawatan yang memberi kesan maksima dengan kos serta kesan sampingan rawatan yang paling minima. Ini kerana populasi atau individu yang berbeza akan memberi respon yang berbeza terhadap ubatan yang berbeza akibat variasi pada jujukan DNA walaupun pada gen yang sama. Maka secara tidak langsung hasil kajian ini nanti dapat digunakan sebagai pemangkin kepada pertumbuhan bidang farmakogenomik di negara ini dan sebagai perbandingan dengan hasil kajian yang telah didapati daripada populasi lain.

## **Bahan dan kaedah kajian**

### *Pengumpulan spesimen darah*

Subjek kajian merupakan pesakit diabetes jenis 2 dan kawalan (bukan diabetes) yang dipilih secara rawak daripada Klinik Rawatan Keluarga (KRK), HUSM. Seramai 50 orang pesakit diabetes jenis 2 yang diperiksa oleh pakar Diabetes dan 50 orang subjek kawalan (tidak menghidap diabetes) dipilih daripada pesakit luar yang, tidak

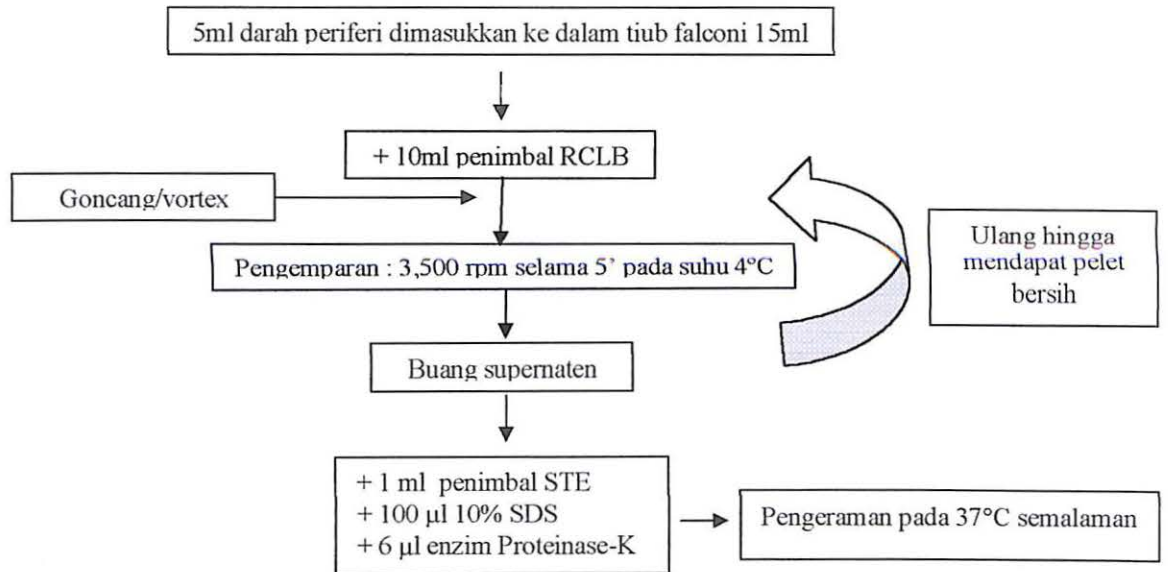
## **Objektif kajian**

Kajian ini dilakukan dengan menetapkan beberapa objektif khusus yang ingin dicapai iaitu:

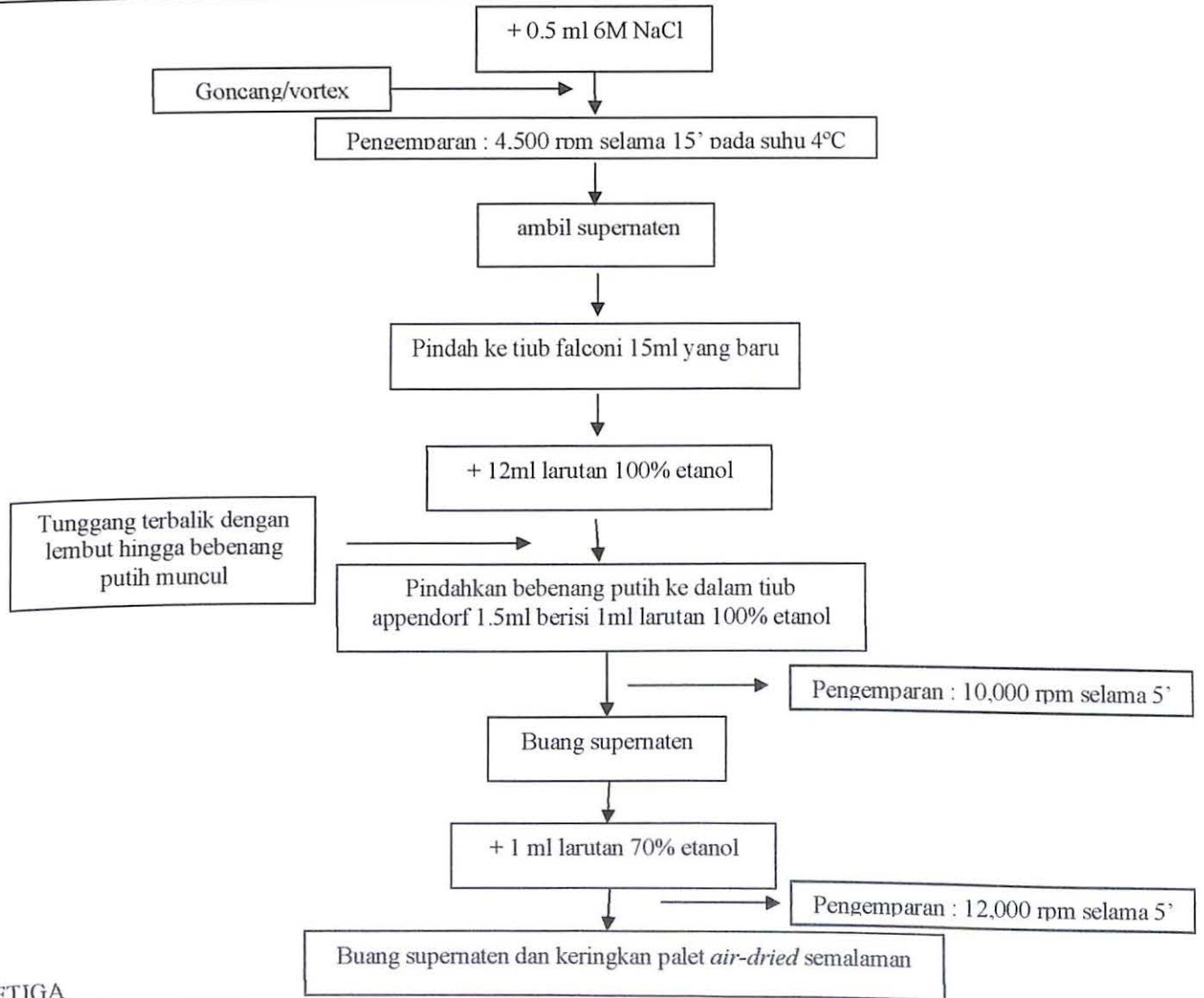
- i) Untuk mengetahui insiden polimorfisma yang berlaku pada gen LEPR,  $\beta_3$ -AR, GRL dan Tnf- $\alpha$  pada pesakit Diabetes jenis 2 dan individu bukan diabetes di kalangan subjek Melayu di Kelantan.
- ii) Untuk mengenalpasti penglibatan polimorfisma gen LEPR,  $\beta_3$ -AR, GRL dan Tnf- $\alpha$  dalam patogenesis Diabetes jenis 2 di kalangan subjek Melayu di Kelantan.
- iii) Untuk membandingkan corak polimorfisma pada gen LEPR,  $\beta_3$ -AR, GRL dan Tnf- $\alpha$  pada pesakit Diabetes jenis 2 Melayu dengan individu bukan diabetes Melayu di Kelantan.
- iv) Untuk menentukan kerentanan paling utama di kalangan gen LEPR,  $\beta_3$ -AR, GRL dan Tnf- $\alpha$  dalam pesakit Diabetes jenis 2 Melayu di Kelantan.



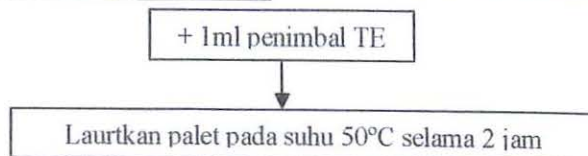
HARI PERTAMA



HARI KEDUA



HARI KETIGA



Rajah 1

Kaedah pengestrakan DNA menggunakan tatacara Miller *et al* (1988).

merokok dan tidak menghidap penyakit darah tinggi. Berat, tinggi dan tekanan darah ketika duduk diukur serta borang soal siasat yang merangkumi jantina, umur, sejarah penyakit diabetes jenis 2 (bagi pesakit) dan sejarah keluarga terhadap penyakit ini diisi oleh kesemua subjek. Kemudiannya 10ml darah diambil daripada subjek dan disimpan dalam tiub EDTA (anti-koagulan) untuk analisa polimorfisma gen. Kesemua subjek (pesakit dan kawalan) telah menandatangani persetujuan untuk terlibat dalam kajian. Kajian ini telah mendapat pengesahan daripada Badan Etika Universiti Sains Malaysia.

#### *Analisa polimorfisma gen*

Analisa genetik molekul dimulakan dengan mengekstrak DNA daripada semua sampel yang didapati. Kaedah pengekstrakan DNA daripada darah periferi ini dilakukan berdasarkan tatacara Miller *et al* (1988) dengan sedikit pengubahsuaian (Rajah 1). Kaedah yang digunakan adalah *non-phenol salting out* procedure. DNA yang telah siap diekstrak dibuat pengukuran kepekatan dan ketulenan DNA bagi memudahkan proses reaksi rantai polimerase (PCR) dilakukan.

Kepekatan DNA sampel-sampel kajian ditentukan melalui bacaan absorbans (daya serapan) pada panjang gelombang 260nm sementara ketulenan DNA ditentukan pada bacaan nisbah ketumpatan optik (O.D) pada 260nm kepada 280nm. Julat ketulenan yang dikehendaki bagi setiap sampel adalah diantara 1.8 hingga 2.0. Setelah pengukuran kepekatan dan ketulenan dibuat, proses elektroforesis 2% gel agaros dibuat bagi memastikan DNA yang telah diekstrak tersebut mempunyai berat molekul yang tinggi serta tidak terdegradasi.

Dalam kajian ini terdapat 4 proses PCR yang berlainan telah dilakukan bagi mengamplifikasi empat gen kajian yang berlainan pada kawasan kajian yang tertentu. Kesemua jujukan pasangan primer dan keadaan PCR adalah merujuk kepada sumber-sumber yang dinyatakan dalam Jadual 2 dengan sedikit pengubahsuaian. Keadaan PCR bagi setiap gen-gen yang dikaji adalah seperti Jadual 3. Kaedah PCR yang dilakukan pada keempat-empat gen ini menghasilkan produk PCR yang bersaiz diantara 100bp hingga 250bp. Kesemua produk PCR yang didapati kemudiannya dianalisa bagi memastikan produk yang dihasilkan adalah seperti yang dikehendaki (saiz yang tepat), tunggal (tiada kontaminasi dan tiada produk yang tidak spesifik) dan pada kepekatan yang tinggi. Analisa yang digunakan adalah elektroforesis 2% gel agaros. Kesemua produk PCR dilarikan bersama penanda DNA 100bp bagi memastikan saiz setiap produk.

**Jadual 2** Jujukan set primer yang digunakan berdasarkan gen-gen yang dikaji, sumber rujukan setiap set primer dan saiz produk PCR bagi setiap gen kajian.

<b>Gen</b>	<b>Sumber rujukan</b>	<b>Jujukan primer</b>	<b>Saiz produk PCR (bp)</b>
<b><math>\beta_3</math>-AR</b>	Rissanen et al. (1997)	F: 5'-CGC CCA ATA CCG CCA ACA C-3' R: 5'-CCA CCA GGA GTA CCA TCA CC-3'	210
<b>Lepr</b>	Oksanen et al. (1999)	F: 5'-ATA ATG GGT AAT ATA AAG TGT AAT AGA-3' R: 5'-AGA GAA CAA ACA GAC AAC ATT-3'	114 / 119
<b>Tnf-<math>\alpha</math></b>	Fernandez-Real et al. (1997)	F: 5'-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT-3' R: 5'-TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG-3'	107
<b>GRL</b>	Kopper et al. (1997)	F: 5'- AGT ACC TCT GGA GGA CAG AT-3' R: 5'-GTC CAT TCT TAA GAA ACA GG-3'	248

**Jadual 3** Keadaan PCR yang digunakan bagi mengamplifikasi kawasan analisa bagi setiap gen kajian.

a) **Gen reseptor  $\beta_3$ -adrenergik**

<b>Proses</b>	<b>Suhu</b>	<b>Masa</b>
1. Pra Denaturasi	94°C	5 min
2. Denaturasi	94°C	35s
3. Penyepuhan	63°C	30s
4. Pemanjangan	72°C	35s
Ulangan proses 2-4		34 x
5. Pemanjangan terakhir	72°C	7 min
<i>Hold</i>	4°C	$\infty$

b) **Gen reseptor Leptin**

<b>Proses</b>	<b>Suhu</b>	<b>Masa</b>
1. Pra Denaturasi	94°C	5 min
2. Denaturasi	94°C	1 min
3. Penyepuhan	63°C	1 min
4. Pemanjangan	72°C	1 min
Ulangan proses 2-4		29 x
<i>Hold</i>	4°C	$\infty$

c) **Gen Faktor Nekrosis Tumor-alfa**

<b>Proses</b>	<b>Suhu</b>	<b>Masa</b>
1. Denaturasi	94°C	3 min
2. Penyepuhan	60°C	1 min
3. Pemanjangan	72°C	1 min
4. Denaturasi	94°C	1 min
5. Penyepuhan	60°C	1 min
6. Pemanjangan	72°C	1 min
Ulangan proses 4-6		34 x
7. Denaturasi	94°C	1 min
8. Penyepuhan	60°C	1 min
9. Pemanjangan	72°C	5 min
<i>Hold</i>	4°C	∞

d) **Gen reseptor Glukokortikoid**

<b>Proses</b>	<b>Suhu</b>	<b>Masa</b>
1. Denaturasi	94°C	1 min
2. Penyepuhan	65°C	1 min
3. Pemanjangan	72°C	1 min
Ulangan proses 1-3		9x
4. Denaturasi	94°C	1 min
5. Penyepuhan	60°C	1 min
6. Pemanjangan	72°C	1 min
Ulangan proses 4-6		14 x
7. Denaturasi	94°C	1 min
8. Penyepuhan	58°C	1 min
9. Pemanjangan	72°C	1 min
Ulangan proses 7-9		19x
Pemanjangan akhir	72°C	30 min
<i>Hold</i>	4°C	∞

Seterusnya kaedah *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) dilakukan terhadap 3 gen kajian iaitu gen reseptor  $\beta_3$ -adrenergik, reseptor glukokortikoid dan Faktor Tumor Nekrosis- $\alpha$  bagi menentukan mutasi titik. Mutasi titik tersebut yang berlaku pada kodon 64 bagi gen reseptor  $\beta_3$ -adrenergik, kodon 363 bagi gen reseptor glukokortikoid dan nukleotida -308 pada gen Faktor Tumor Nekrosis- $\alpha$ . Gen reseptor Leptin tidak memerlukan kaedah ini kerana kajian yang dibuat terhadap gen ini adalah kajian polimorfisma penyisipan/delesi (I/D) dan kehadiran alel penyisipan dapat dibezakan dengan melakukan *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (PAGE) yang berkepekatan tinggi. Kesemua enzim restriksi yang digunakan, keadaan pengeraman serta hasil RFLP yang dijangkakan dinyatakan dalam Jadual 4. Penggunaan kaedah RFLP ini amat mudah dan tepat memandangkan enzim restriksi yang digunakan akan dapat mengenalpasti sebarang perubahan nukleotida pada titik pemotongan yang juga merupakan titik mutasi yang dikaji.

Setelah proses RFLP dilakukan, ketiga-tiga gen tersebut diperhatikan dengan menggunakan kaedah elektroforesis yang berbeza samada dari segi jenis medium yang digunakan, kepekatan medium elektroforesis dan jangkamasa elektroforesis yang dijalankan. Kesemua kaedah dan keadaan elektroforesis yang digunakan untuk memerhatikan mutasi pada keempat-empat gen dinyatakan dalam Jadual 5. Sampel-sampel yang menunjukkan mutasi dihantar untuk penjujukan (sequencing) untuk mengesahkan mutasi yang berlaku.

**Jadual 4** Jenis-jenis enzim restriksi serta keadaan RFLP yang digunakan bagi setiap gen-gen yang dikaji.

Gen	Enzim restriksi (bilangan unit yang digunakan)	Keadaan pengeraman	Hasil RFLP (bp)		
			Jenis liar	Mutan	
				Homo	Ht
$\beta_3$ -AR	MvaI (10U)	37°C / 4 jam	100	165	165
			65		100
					65
Tnf- $\alpha$	NcoI (10U)	37°C / 16 jam	87	107	107
			20		87
					20
GRL	Tsp509I (6U)	65°C / 15 jam	134	153	153
			100		134
					100



**Jadual 5** Jenis-jenis serta keadaan elektroforesis yang digunakan bagi memerhatikan mutasi yang terdapat pada gen-gen yang dikaji.

<b>Gen</b>	<b>Elektroforesis</b>	<b>Keadaan elektroforesis</b>
<b><math>\beta_3</math>-AR</b>	3.5% gel agaros	Dalam medium penimbal 1x TBE, pada 100V, suhu bilik selama 2 jam Pewamaan: Ethidium bromida ( <i>Pre-stain</i> )
<b>Lepr</b>	12.5% PAGE	Dalam medium penimbal 1x TBE, pada 200V, suhu 20°C selama 16 jam Pewamaan: Silver staining ( <i>Post-stain</i> )
<b>Tnf-<math>\alpha</math></b>	4.0% gel agaros	Dalam medium penimbal 1x TBE, pada 100V, suhu bilik selama 2 jam Pewamaan: Ethidium bromida ( <i>Post-stain</i> )
<b>GRL</b>	4.0% gel metafor	Dalam medium penimbal 0.5x TBE, pada 90V, suhu 20°C selama 5 jam Pewamaan: Ethidium bromida ( <i>Post-stain</i> )

## Keputusan

Penggunaan elektroforesis yang berlainan bagi menganalisa polimorfisma yang wujud dalam keempat-empat gen tersebut adalah berdasarkan saiz produk RFLP dan beza saiz antara fragmen-fragmen yang ingin diperhatikan. Berikut adalah contoh pemerhatian yang dapat dibuat pada setiap jenis elektroforesis yang dilakukan pada gen reseptor Leptin (Gambarfoto 8), gen reseptor  $\beta_3$ -adrenergik (Gambarfoto 9), gen reseptor glukokortikoid (Gambarfoto 10) dan gen Tnf- $\alpha$  (Gambarfoto 11).

Bagi **polimorfisma penyisipan/delesi pentanukleotida pada 3'-UTR pada gen reseptor leptin**, peratusan polimorfisma yang ditunjukkan dalam sampel pesakit dan kawalan adalah agak tinggi berbanding populasi lain. Bagi sampel pesakit, sebanyak 74% menunjukkan homozigus delesi/delesi (D/D), manakala bagi kawalan adalah 72%. Bagi kumpulan heterozigus penyisipan/delesi (D/I), sampel kawalan menunjukkan peratusan genotip yang lebih tinggi iaitu 24% berbanding sampel pesakit (18%). Namun keadaan yang sebaliknya berlaku dalam varian homozigus penyisipan/penyisipan di mana peratusan genotip yang lebih tinggi (~ dua kali ganda) dapat diperhatikan dalam sampel pesakit (8%) berbanding dalam sampel kawalan (4%). Taburan kekerapan genotip yang ditunjukkan dalam kedua-dua sampel pesakit dan kawalan ditunjukkan dalam Jadual 6. Kekerapan alel penyisipan yang ditunjukkan dalam sampel pesakit adalah lebih tinggi dalam pesakit (0.17) berbanding 0.16 dalam kawalan (Rajah 2). Namun kedua-duanya adalah tidak berbeza secara signifikan dan didapati polimorfisma penyisipan/delesi pentanukleotida pada 3'-UTR pada gen reseptor leptin adalah tidak berhubung kait secara statistik dengan diabetes jenis 2 ( $p < 0.05$ ).