مجله دیابت و لیپید ایران. آذر- دی ۱۳۹۰؛ دوره ۱۱ (شماره ۲) ۱۴۷-۱۳۸

موتاسیون‌های جدید در ولفرامین با نگاهی به ساختمان پروتیین

آزاده ابراهیم حبیبی[۱]، مهسا محمدآملی[۱]، روشنک عباسی[۱]، فرزانه عباسی[۱*]

چکیده

مقدمه: سندرم ولفرام یک اختلال ژنتیکی است که کیفییت زندگی افراد مبتلا را تحت تأثیر قرار می‌دهد. به منظور پیشگیری و درمان آن درک بهتر پاتوژنز سندرم ولفرام از طریق آنالیز محصولات حاصله از اختلال در ژن مسئول در ایجاد بیماری (پروتین ولفرامین)کمک کننده می‌باشد.

روش‌ها: از ۷ مورد بیمار با تشخیص سندرم ولفرام بر اساس علایم کلینیکی و آزمایشگاهی خونگیری بعمل آمده و DNA از نمونه حاصله استخراج گردید. تمامی ناحیه .اگزون ۸ ژن WFS1 برای وجود موتاسیون با استفاده از روش PCR-Squencing توالی یابی و سپس برای بررسی بیشتر موتاسیون های یافت شده با استفاده از روش مدل سازی رایانه‌ای تاثیر موتاسیون در سطح پروتئین بررسی شد.

یافته‌ها: ۵ موتاسیون موثر بر ساختار پروتیین یافت شدند که از بین آنها Q486X و E717K قبلاً گزارش شده بودند ولی موتاسیون‌های E752K,A684G,W588X جدید بودند. از این بین موتاسیون E717K که در بین سایر جمعیت‌ها نادر به حساب می‌آید، در تمام بیماران مورد مطالعه کنونی مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که مکان‌های ۶۸۴ و ۷۵۲ در پروتیین ولفرامین نقاط حساس برای موتاسیون باشند. با توجه به نتایج ذکر شده در فوق، وجود موتاسیون E717K را می‌توان شناسه‌ای برای سندرم ولفرام در جمعیت ایرانی دانست.

واژگان کلیدی: سندرم ولفرام، موتاسیون، آتروفی عصب اوپتیک

۱- مرکز تحقیقات غدد/ پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* ***نشانی:*** تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران، کد پستی ۱۴۱۱۴۱۳۱۳۷ تلفن: ۸۸۲۲۰۰۳۷، نمابر: ۸۸۲۲۰۰۵۲ ، پست الکترونیک: f_abbasi@sina.tums.ac.ir

تاریخ دریافت:۹۰/۰۴/۱۲ **تاریخ درخواست اصلاح: ۹۰/۰۶/۲۵** **تاریخ پذیرش: ۹۰/۰۷/۱۷**

مقدمه

سندرم ولفرام یک اختلال ژنتیکی نادر می‌باشد که به شکل اتوزومال مغلوب به ارث می‌رسد. تشخیص آن معمولاً بر اساس علایم کلینیکی بیماری بوده که شامل چند جزء از جمله دیابت قندی غیر ایمونولوژیک و آتروفی پیشرونده عصب بینایئ است که معمولاً در دهه اول زندگی عارض می‌شوند [۱].

با پیشرفت بیماری تعدادی از بیماران علایم دیابت بیمزه مرکزی و کاهش شنوایی حسی عصبی را تجربه می‌کنند. به همین علت بیماری با نام DIDMOAD هم شناخته می‌شود که مخفف(دیابت بی‌مزه مرکزی دیابت شیرین آتروفی عصب بینایی و کری حسی عصبی) می‌باشد.

نشانه های نورودژنرایتو نیز در سندرم ولفرام وجود دارد که شامل آتونی مثانه و هیدرویورترونفروزیس، سربرال آتاکسی و نوروپاتی همراه با علایم قلبی و سیستم گوارشی، کاتاراکت، رتینوپاتی، میوکلونوس، نوروپاتی محیطی، اختلالات روان‌تنی و عقب افتادگی ذهنی است [۳،۲].

مشکلاتی در سیستم آندوکرین مانند اختلال در عملکرد هیپوفیز قدامی، کوتاهی قد تأخیر بلوغ و اختلالات اولیه و ثانویه در عملکرد گنادها نیز گزارش شده‌اند [۳و۴]. محدوده وسیعی از اختلالات نورولوژیک وجود دارند که منجر به بستری شدن ۲۵٪ از این بیماران می‌شوند [۵].

دیده شده که حتی در حاملین هتروزیگوت ژن موتاسیون یافته، احتمال بستری شدن تا ۲۶ بار بیشتر بوده است و به نظر می‌رسدکه موتاسیون‌های خاص در ژن ولفرام می‌تواند فاکتور مهمی برای بروز اختلالات روانی در جمعیت عمومی باشد [۶].

شایع‌ترین زمان مرگ در بیماران مبتلا به سندرم ولفرام در دهه چهارم زندگی و اکثراً به علت نارسایی تنفسی به دنبال آتروفی ساقه مغز می‌باشد [۷]. نارسایی کلیوی عامل دوم مرگ و میر است [۱].

شیوع سندرم ولفرام حدود یک در صدهزار در جمعیت آمریکایی و در نوزادان زاده شده در انگلیس یک در هفتصدوهفتاد هزار با میزان ناقلی ۳۴/۱ تخمین زده شده است[۹،۱،۸].

ژن سندرم ولفرام ۳۳/۴ کیلو بایت و شامل ۸ اگزون بوده و برای اولین بار در سال ۱۹۹۸ بر روی کروموزوم ۴ بازوی کوتاه قطعه ۱۶/۱ کشف شد. اگزون ۸ از همه طویل تر بوده و شایعترین محل برای موتاسیون در ژن سندرم ولفرام می‌باشد [۱۱].

RNA پیامبر ژن سندرم ولفرام در قلب مغز ریه ها بند ناف و پانکراس بیان می‌شود. محصول نهایی ژن پروتئینی است به نام ولفرامین که شامل ۸۹۰ اسید آمینه بوده ودارای ۹ سگمان بین غشایی است [۱۲]. در ضمن یک پروتئین الیگومر با ۴ ساب یونیت می‌باشد [۱۳].

به نظر می‌رسد که پروتئین ولفرامین نقش کانال کلسیمی و یا تنظیم کننده برای شبکه آندوپلاسمیک کانال کلسیم را بازی کند که در آن کلسیم توسط مسیر فعال کننده اینوزیتول تری فسفات آزاد شده و یا عملکرد خود را از طریق کانال‌های پتاسیمی حساس به کلسیم اعمال می‌کند که نتیجه این دو، تثبیت غشای سلولی در طی آزادسازی کلسیم است.

به این ترتیب در بعضی از موتاسیون‌ها حساسیت به یون‌های کلسیم و سدیم کاهش می‌یابد. شبکه آندوپلاسمیک محلی برای بروز تعدادی از پروسه های مهم درون سلولی مانند فولدینگ و پروسس پروتئین های سنتز شده و ذخیره سازی یون‌های کلسیم است لذا اختلال در عملکرد طبیعی آن موجب بروز پدیده ای با عنوان "استرس شبکه آندوپلاسمیک" می‌گردد [۱۵].

به عنوان مثال بیان موقتی اشکال ناقص پروتئین ولفرامین یکی از عوامل بروز "استرس شبکه آندوپلاسمیک"بوده که بخصوص در سلول‌های بتای پانکراس منجر به تخریب آنها می‌شود [۱۶].

تخریب سلول‌های عصبی که شاخصی از سندرم ولفرام می‌باشند نیز به دلیل بروز آپوپتوزیس در شبکه آندوپلاسمیک رخ میدهد [۱۷].

موتاسیون در ژن سندرم ولفرام در ارتباط با کری حسی و عصبی و دیابت نوع یک در زمینه غیر خود ایمنی می‌باشد [۱۹،۱۸]. همچنین نشان داده شده است که ارتباطی بین خطر بروز دیابت نوع دو و اشکالی از موتاسیون‌های موجود در این ژن وجود دارد [۲۲-۲۰].

تشخیص زودرس و درمان به موقع با جایگزینی هورمون‌ها، در تغییر کیفیت زندگی و طول عمر آنها تأثیر بسزایی دارد [۲۲]، در ضمن تشخیص قبل از تولد مشاوره ژنتیک خانواده های در معرض خطر در پشگیری و درمان زودرس سندرم ولفرام کمک کننده است [۲۳،۲۴].

در این مطالعه علایم کلینیکی و مطالعه مولکولی ۷ بیمار مبتلا به سندرم ولفرام مورد مطالعه قرار گرفته است که در آن ۲ موتاسیون حذفی و یک موتاسیون منجر شونده به تغییر اسید آمینه جدید بعلاوه دو موتاسیونی که قبلا" گزارش شده، مشخص گردید.

روش‌ها

معیارهای ورود به مطالعه شامل: بروز دیابت در کودکی و یا نوجوانی به همراه آتروفی عصب اپتیک می‌باشد. تشخیص دیابت بر اساس معیارهای انجمن دیابت آمریکا (ADA) و تشخیص آتروفی عصب اپتیک از طریق معاینه اوفتالموسکوپیک تایید گردید. تست محرومیت از آب برای تمام بیماران جهت تشخیص دیابت بیمزه و ادیومتری برای تشخیص کری حسی و عصبی انجام شد. دو اندیکاتور اصلی برای تشخیص هیدرویورترونفروز سونوگرافی از کلیه و مجاری ادراری و اندازه گیری حجم ادرار بعد از دفع نیز انجام شد.

در مواردی که کوتاهی قد وجود داشت (SDS<-2.5) تست تحریکی هورمون رشد با دو روش (استفاده از کلونیدین وبعد ورزش) انجام شد. در نهایت تشخیص هیپوگنادیسم بر اساس علایم بالینی و تست های تحریکی با هورمون محرکه گنادوتروپین تایید شده است. از تمامی بیماران رضایت نامه کتبی کسب شد.

تخلیص DNA و تعیین سکانس

نمونه خون جمع آوری شده از بیماران و خانواده آنان در لوله های حاوی EDTA و با استفاده از روش Saling out استخراج شد انالیز مولکولی اگزون ۸ زن سندرم ولفرام با استفاده از پرایرمرهایی که قبلا" طراحی شده است[۷] به روش PCR و سکانس مستقیم انجام شد. این روش برای تمام بیماران و چندین نمونه کنترل بکار گرفته شد.

مدل‌سازی پروتئین

توالی اسید آمینه ولفرامین از بانک اطلاعاتی پروتئین NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein) و با توجه به کد GenBank Y18064.1 بدست آمد. پیشگویی توپولوژی پروتئین با استفاده از سرور های ذیل انجام شد: TOPCON (25), SOSUI(26), PRED-TMR server(27), HMMTOP server (www.enzim.hu/hmmtopand) (28)

ساختار پیش بینی شده منتخب با استفاده از نرم افزار TOPO2 (http://www.sacs.ucsf.edu/TOPO2/) ترسیم شد. جهش‌های یافت شده در توالی ژن با استفاده از سرور ExPASy Proteomics (http://www.expasy.ch/tools/dna.html) به سطح پروتئین تعمیم داده شد. جهت بررسی میزان محافظت اسید آمینه های جهش یافته، توالی پروتئین ولفرامین با استفاده از ابزار NCBI Blast (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov) با سایر پروتئین های موجود در بانک اطلاعاتی مقایسه شد.

یافته‌ها

یافته‌های بالینی و آزمایشگاهی

۷ بیمار(۳ زن و ۴ مرد) در سنین ۱۶-۳۵ سال مورد مطالعه قرار گرفتند. بیماران ۲-۵ خواهر و برادر بوده و همگی تحت عمل جراحی به علت مثانه نوروژنیک قرار گرفته بودند. در سابقه خانوادگی دایی بیمار شماره ۱، مادر و مادر بزرگ بیماران شماره ۲-۵ و مادر بیمار شماره ۶ همگی به دیابت نوع ۲ مبتلا بودند.

در جدول شماره ۱ خلاصه ای از یافته های آزمایشگاهی و بالینی سن بیماران در زمان شروع علایم بیماری آمده است.نکته قابل توجه اینست که در تمام بیماران توالی بروز علایم بیماری بصورت دیابت قندی و بدنبال آن دیابت بیمزه بود (بجز بیمار شماره ۷) و سپس آتروفی عصب اپتیک و کری حسی و عصبی بروز کرده است.

بجز بیمار شماره ۱، تمام بیماران از درجاتی از بیماری روانی رنج می‌بردند.

اتساع مجاری ادراری و مثانه نوروژنیک تنها در بیماران شماره ۲-۵ و هیپوگنادیسم هیپو گنادوتروپیک تنها در

بیمار شماره ۶ وجود داشت.کمبود هورمون رشد تنها در بیماران شماره ۶و۷ مشاهده گردید.آخرین یافته قابل توجه وجود ارتباط فامیلی در پدر و مادر تمام بیماران بجز بیمار شماره ۱ بود.

یافته‌های ژنتیکی

موارد یافت شده در اگزون ۸ ژن سندرم ولفرام در بیماران در جدول شماره ۲ نشان داده شده اند. موتاسیون ناحیهc.2149 G>A که باعث تعییر اسید آمینه E717K میشود در تمامی بیماران مشاهده شد.موتاسیون C>T c.1465 در تمامی خواهران و برادران و بیماران ۵-۲ خانواده مبتلا به بیماری یافت شد که این موتاسیون قبلا"گزارش شده و باعث حذف اسید آمینه Q486X میشود.

۳ موتاسیون جدید در بیماران ۶و۷ یافت شد که شامل c.1763 G>A بوده که باعث حذف اسید آمینه W588X (شکل ۱) و موتاسیون ناحیه c.2051 C>G و تغییر اسید آمینه A684G در بیمار شماره ۶ شده است. و موتاسیون ناحیه c.2254 G>A که باعث جابجایی اسید آمینه E752K در بیمار ۷ شده نیز حاصل همان موتاسیون می‌باشد.

سایر موتاسیون‌های یافت شده شامل ۱۰ پلی مورفیسم شایع از جمله c.997 A>G است که باعث تغییر اسید آمینه های c.2565 A>G 1332V, و c.1185 T>C,C.2720 C>T,c.1832 G>A,c.2433 G>A, c.2764 C>T می‌شوند. دو موتاسیون c.1762 T>G و c.1963 G>A به ترتیب باعث تغییر در اسید آمینه های W588G و E655K می‌گردند.

تعدادی موتاسیون نیز یافت شد که باعث هیچ تغییری در اسید آمینه نمی شوند که عبارتند از : c.2565 A>A, c.2720 T>G,c.1185 C>T,c.1832 G>A, c.2433 G>A ,c.2746 G>T ,c.2822 G>A.

یافته‌های مدل‌سازی پروتئین

در مورد ساختار سه بعدی پروتئین های غشایی اطلاع زیادی در دست نیست. بدست آوردن این پروتئین‌ها و آماده‌سازی آنها برای مطالعات ساختار سه بعدی مشکلات عملی زیادی را در بر دارد، و به همین علت روش‌های مدلسازی رایانه‌ای در این زمینه کاربرد زیادی پیدا کرده است [۲۹]. روش‌های موجود که در پیشگویی ساختار این نوع پروتئین‌ها به کار می‌رود شامل الگوریتم‌هایی است که به صورت تقریبی محل قرار گیری قطعات غشایی را تعیین می کند و توپولوژی کلی پروتئین را بدست می دهد. با استفاده از سرور SOSUI، اسید آمینه های ۳۵۸-۶۷۷ به صورت ۸ مارپیچ غشایی پیش بینی شدند. دو سرور HMMTOP و PRED-TMR اسید آمینه های ۳۱۴-۶۵۲ را به صورت ۹ مارپیچ پیش بینی کردند. نهایتا" سرور TMHMM اسید آمینه های ۳۱۱- ۶۵۲ را به صورت ۱۰ مارپیچ و TOPCONS اسید آمینه های ۳۱۷-۶۵۵ را به صورت ۱۱ مارپیچ پیش‌بینی کردند. در همه پیشگویی ها اولین اسید آمینه اولین مارپیچ و آخرین اسید آمینه آخرین مارپیچ تقریبا" در موقعیت مشابهی قرار داشتند و تنها مورد استثنا سرور SOSUI بود. نتایج پیشگویی HMMTOP به عنوان بهترین مدل در نظر گرفته شد. مجموعاً از زمانی که نخستین مطالعات بر محصول ژن WFS1 انجام شده، مدل شامل ۹ مارپیچ بیش از همه مورد تایید بوده است [۳، ۱۲] و در عین حال نتایج مطالعات تجربی نیز احتمال وجود این توپولوژی را قوی‌تر کرده است [۱۳]. مارپیچ‌های پیش‌بینی شده شامل این قطعات اسید آمینه‌ای هستند: ۳۱۴-۳۳۳، ۳۴۲-۳۶۱، ۴۰۵-۴۲۳، ۴۳۲-۴۵۱، ۴۶۴-۴۸۱، ۴۹۶-۵۱۵، ۵۲۸-۵۴۹، ۵۶۴-۵۸۳ و ۶۳۵-۶۵۲. تصویر ترسیم شده این پیش‌بینی، و محل جهش‌های یافت شده در شکل ۲ آورده شده است. در مورد سه مورد جهش A684G, E717K, E752K توالی پروتئین انسان با سایر گونه ها مقایسه شد. در مورد A684 درجه حفاظت شدن زیاد است و این اسید آمینه در تمامی پروتئین های مورد بررسی مشابه ولفرامین یافت شد: پروتئین های دارای ۹۰٪ مشابهت شامل Pongo abelii, Macaca mulatta, Ailuropoda melanoleuca , Equus caballus, Mus musculus, Rattus norvegicus, Monodelphis domestica, Canis familiaris تا ۷۰ و ۸۷٪ مشابهت Gallus gallus , Taeniopygia guttata, Xenopus laevis, Danio rerio, Tetraodon nigroviridis و پروتئین‌های دارای ۴۶٪ تشابه شامل Saccoglossus kowalevskii and Apis mellifera همه واجد این اسید آمینه بودند. در مورد E717K نیز این اسید آمینه در اکثر

پروتئین های مورد بررسی موجود بود، به استثنای Danio rerio که در آن آسپاراژین در این مکان قرار داشت و Apis mellifera (دارای ۴۶ ٪ تشابه و ۲۶٪ عینیت با توالی انسان) که در این توالی نیز آلانین جانشین گلوتامات شده بود. در مورد E752 نیز حفاظت شدگی تا حد زیادی دیده می شود . تنها مورد استثنا جانشین شدن گلوتامین در Saccoglossus kowalevskii (دارای ۲۶٪ عینیت با توالی انسان) می‌باشد.

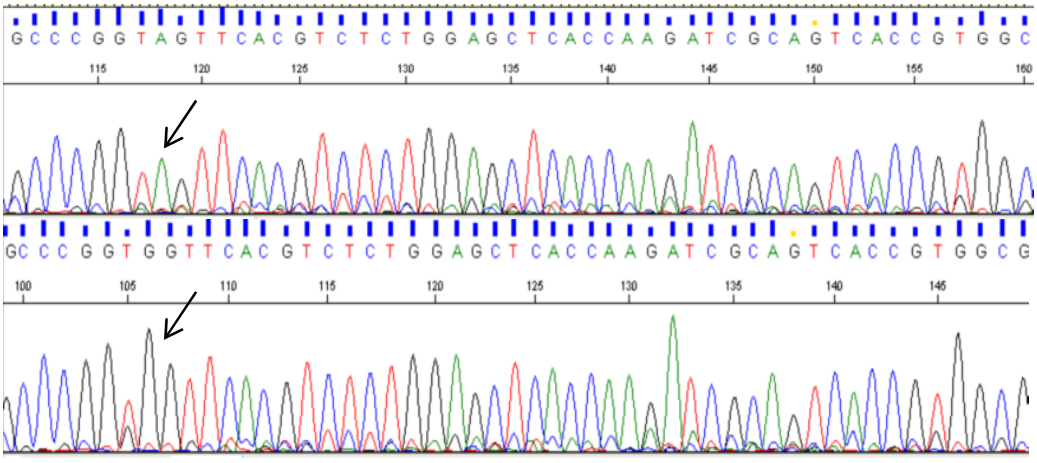
جدول ۱- مشخصات دموگرافیک و کلینیکی بیماران اعداد موجود در ستون دوم حاکی از سن شروع هر یک از علایم سندرم ولفرام می‌باشد.

بیماران	سن	جنس	دیابت بیمزه	دیابت قندی	آتروفی عصب بینایی	کری	اتساع مجاری ادراری	هیپوگوناديسم اوليه	مشکلات روانی	کمبود هورمون رشد	ارتباط فامیلی
1	20	M	6	2	13	15	-	-	-	-	-
2	30	F	11	8	15	20	+	-	اختلال دو قطبی	-	+
3	32	F	12	9	17	22	+	-	اختلال دو قطبی	-	+
4	28	M	11	9	13	18	+	-	اختلال دو قطبی	-	+
5	35	F	10	8	20	20	+	-	اختلال دو قطبی	-	+
6	22	M	15	10	15	14	-	+	تشنج(صرع بزرگ)	+	+
7	16	M	-	3	9	16	-	-	اختلال وسواسی جبری	+	+

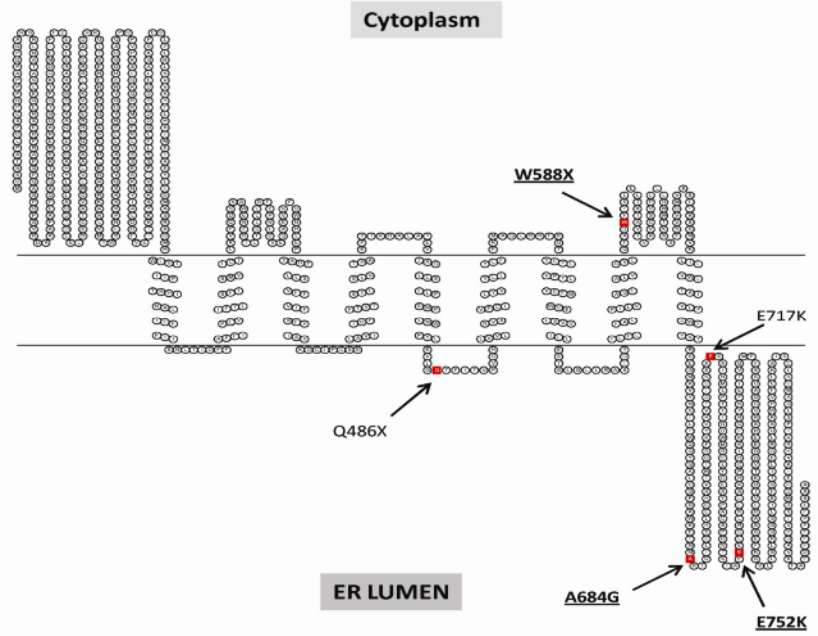
M : مرد، F: زن

جدول ۲- موتاسیون‌های حذفی در سندرم ولفرام

بیماران	اگزون	تغییر در نوکلئوتید	تغییر در آمینو اسیدها
1	8 e	c.2149 G>A	E717K
2	8 e	c.2149 G>A	E717K
	b	c.1456 C>T	Q486X
3	8 e	c.2149 G>A	E717K
	b	c.1456 C>T	Q486X
4	8 e	c.2149 G>A	E717K
	b	c.1456 C>T	Q486X
5	8 e	c.2149 G>A	E717K
	b	c.1456 C>T	Q486X
	8 e	c.2149 G>A	E717K
6	d	c.1763 G>A	W588X (novel)
	e	c.2051 C>G	A684G (novel)
7	8 e	c.2149 G>A	E717K
	e	c.2254 G>A	E752K (novel)



شکل ۱- قسمتی از کروماتوگرام تهیه شده از محل موتاسیون جدید(W588K) c.1763 A



ER: endoplasmic reticulum

شکل ۲- مدل فرضی پروتیین ولفرامین.سگمانهای داخل غشائی به تعداد۹ عدد همراه با جایگاه موتاسیون یافت شده نشان داده شده است. موتاسیون‌ها با مربع قرمز و این بین موتاسیون‌های جدید با خط زیرین مشخص شده اند.

بحث

این مطالعه یکی از اولین مطالعات انجام شده بر روی بیماران مبتلا به سندرم ولفرام در ایران می‌باشد. از ۷ بیمار مورد مطالعه ۴ بیمار ارتباط خواهر و برادری داشتند و موتاسیون های یکسانی را نشان دادند و به تبع علایم بالینی نیز در تمامی آنها مشابه بود.سه بیمار دیگر نسبت فامیلی نداشتند.

از بین موتاسیون های یافت شده در بیماران مورد مطالعه موتاسیون c.2149 G>A که منجر به تغییر در اسید آمینه E717K می‌شود در تمام بیماران یافت شد. این یافته می تواند مهم باشد زیرا مطالعات قبلی تنها در چند مورد گزارش شده است. یکی در غربالگری زنان مبتلا به سندرم ولفرام در بیماران مبتلا به اختلالات روانی است که در چند کشور انجام شده است (انگلیس آمریکا و یونان) که از مجموع ۱۱۹ بیمار، ۱۵ بیمار حامل موتاسیون فوق الذکر بودند[۳۰] و دیگری مربوط است به یک گزارش شخصی از Wuyts [۳۱].در مطالعه حاضر بیمار شماره ۱ از بین تمام موتاسیون‌های موجود فقط این موتاسیون را همراه داشت و علایم بالینی وی شامل دیلبت قندی زودرس و بروز ۴ علامت اصلی سندرم ولفرام تا سن ۱۵ سالگی بود.

لازم به ذکر است که علایم روانی و اختلالات سیستم ادراری در این بیمار وجود نداشت. در گزارش‌های موجود، موتاسیون حذفی در اسید آمینه A716T منجر به کری حسی عصبی می‌گردد [۱۸].

در مدل پروتئین (شکل ۲)، توالی ۶۳۲-۶۵۲ در نهمین و آخرین قطعه غشایی ولفرامین است و به این ترتیب محتمل است که اسید آمینه ۷۱۷ در لومن رتیکولوم اندوپلاسمی قرار گیرد. چنانکه در پیش ذکر شد، E717 (گلوتامات ۷۱۷) در میان گونه های مختلف اسید آمینه بسیار محافظت شده ای است. از نظر بیوشیمیایی، جهش گلوتامات به لیزین با اهمیت است، زیرا باعث معکوس شدن علامت بار اسید آمینه می شود. ولیکن از آنجا که ارتباط میان ساختار و فعالیت این پروتئین شناخته شده نیست، به راحتی نمی توان در مورد اهمیت عملکرد اسید آمینه هایی اظهار نظر کرد که خارج از قطعات غشایی و یا لوپ‌های مرتبط کننده واقع شده اند.

در ضمن باید ذکر شود که در سایر روش‌های به کار برده شده برای پیش بینی ساختار نیز، اسید آمینه ۷۱۷ به عنوان قطعه مارپیچ غشایی پیش بینی نشده است. از سوی دیگر، دلایلی مبنی بر احتمال بر هم کنش بین بخش C – ترمینال

پروتئین (اسید آمینه های ۶۵۲-۸۹۰) مربوط به قطعه موجود در لومن رتیکولوم اندوپلاسمی و زیرواحد بتا ۱ سدیم پتاسیم ATPase وجود دارد. قابل توجه است که در سلول‌های محتوی نوع جهش یافته W700X ولفرامین، ۹۰٪ کاهش فعالیت زیر واحد بتا ۱ سدیم پتاسیم ATPase مشاهده شده است.

این پروتئین در نهایت در غشای پلاسمایی قرار می‌گیرد ولیکن در طی زمان گذرای حضورش در رتیکولوم اندوپلاسمی، ولفرامین می‌تواند نقش تسهیل کننده در تجمع زیر واحدهای آن ایفا کند. از آنجا که نقص در سدیم پتاسیم ATPase در آپوپتوز و بیماری های تخریب کننده سیستم عصبی نقش دارد، احتمال دارد که کمبود آن در بروز علائم مشاهده شده در سندرم ولفرام موثر باشد و به این ترتیب عدم برهم کنش مناسب میان زیرواحد بتا ۱ سدیم پتاسیم ATPase و ولفرامین می توان از عوامل دخیل در ایجاد استرس رتیکولوم اندوپلاسمی باشد [۳۲].

به طور کلی بدلیل بروز نادر این موتاسیون در سایر جمعیت‌ها [۳۰-۳۲] و وجود آن به عنوان تنها موتاسیون در بیمار شماره ۱ میتوان E717K راشناسه ای برای سندرم ولفرام در جمعیت ایرانی دانست البته قطعیت آن با مطالعه تعداد بیشتری از بیماران اثبات خواهد شد.

در خواهران و برادران (بیماران شماره ۵-۲) علایم کلینیکی شامل اختلال روانی دو قطبی و مثانه نوروژنیک تقریباً در تمام بیماران یکسان بود با اندکی تفاوت در سن بروز علایم (برای مثال کری حسی عصبی و یا آتروفی عصب بینایی).

تمام این بیماران موتاسیون های مشابهی داشتند. موتاسیون اصلی که در آنان پیدا شد c.1456 C>T بود که منجر به غیر فعال شدن اسید آمینه Q486X می‌شود که منجر به حذف پروتیین بعد از پنجمین قطعه داخلی می‌گردد (شکل ۲). بر این اساس می‌توان این موتاسیون را تنها موتاسیون قابل مشاهده در سطح ژنی دانست بنابراین این موتاسیون را هم می‌توان بعنوان مارکری برای سندرم ولفرام تلقی نمود. تغییر در اسید آمینه Q486X قبلاً در یک بیمار ایتالیایی گزارش شده است [۷]. در مطالعه حاضر حذف قسمتی از پروتیین بدنبال موتاسیون در ژن ذکر شده با علایم کلینیکی موجود در بیماران در ارتباط می‌باشد.

تنها بیمار شماره ۶ مبتلابه هیپوگنادیسم بود و علایم سندرم ولفرام در سن ۱۰ سالگی شروع شده و تمامی علایم DIDMOD تا سن ۱۵ سالگی در بیمار بارز شدند. در ضمن کمبود هورمون رشد و تشنج نیز علایم بیماری را همراهی می کرد.

موتاسیون‌های جدید از جمله c.1763 G>A که موجب تغییر در اسیدآمینه W588X می‌شود و c.2051 C>G که منجر به حذف در اسید آمینه A684G می‌گردد هر دو در این بیمار وجود داشت. تغییر در اسید آمینه W588X موجب حذف در قطعه هفتم ترانس ممبران سلولی می‌گردد که می‌تواند علت احتمالی شدت بروز علایم مشاهده شده در بیمار باشد. نکته قابل توجه اینست که C.2051 ناحیه مستعد برای موتاسیون شناخته شده است. (Lesperance MM. WFS1 Gene Mutation and Polymorphism Database (URL: http://www.khri.med.umich.edu/research/lesperance_lab/low_freq.php)؛ تنها بیماری که دیابت بیمزه نداشت و به همین خاطر علایم بیماری در او خفیف‌تر بود، بیمار شماره ۷ بود. البته می‌بایستی به سن پایین بیمار نیز توجه نمود.

یک موتاسیون جدید در این بیمار یافت شد که عبارت است از E752K که تا حدودی قابل مقایسه با E717 می‌باشد. ولی ارتباط بین این موتاسیون و علایم بیمار کاملاً قابل تطبیق نیست. موتاسیون نان سنس در این اسید آمینه قبلا" گزارش شده است [۱۱،۳].

در تمام بیماران بجز بیمار شماره ۷ سابقه وجود دیابت در پدر و مادر و یا اقوام درجه دوم وجود دارد. این بدان معناست که حاملین هتروزیگوت برای زن سندرم ولفرام وجود دارند. ارتباط بین اشکال مختلف سندرم ولفرام با دیابت نوجوانی نیز نشان داده شده است [۳۳] و همان طور که قبلاً اشاره شد، ارتباط بین سندرم ولفرام و دیابت نوع دو نیز وجود دارد [۲۱،۲۰].

در این مطالعه تقریباً ارتباطی بین ژنوتیپ و فنوتیپ بیماران وجود نداشت. گزارش‌های موجود در مورد سندرم ولفرام حاکی از اینست که بعضی از بیماران فاقد یک یا چند مورد از علایم آن می‌باشند، به عنوان مثال بیمار زن ۳۲ ساله که

فاقد دیابت بیمزه بوده [۳۴] و یا مرد ۱۸ ساله فاقد کری و دیابت بیمزه بوده است[۳].

از طرف دیگر با گذشت زمان علایم بیماری می‌توانند وخیم تر شوند. در این مطالعه اختلاف بین سن افراد مورد مطالعه می‌تواند موید این نکته باشد و وجود بعضی از ژنوتیپ ها می‌تواند منجر به علایم خفیف تر بیماری شود [۳۵]. در بیماران بررسی شده در این مقاله ارتباط بین ژنوتیپ و فنوتیپ در موارد موتاسیون‌های غیرفعال کننده بیشتر از مواردی بود که موتاسیون‌های منجر به حذف داشتند [۳۶].

یک چالش موجود در این زمینه، تمایز بین جهش های غیرفعال کننده و جهش های با تاثیر کمتر است. در این موارد، یکی از مطالعات که با هدف بررسی تاثیر جهش های نقطه ای (در محیط آزمایشگاه) انجام شده است این نتیجه را ارائه داده است که جهش های ولفرامین منجر به ایجاد پروتئینی می شوند که بوسیله سازوکارهای محافظتی سلولی تخریب می گردند. پروتینی‌های مورد بررسی در این مطالعه شامل P504L, R629W, P724L, P885L, F883X،W700X می‌باشد. F883X،R629W, W700X دچار تجمع می شوند، ولیکن سندرم ولفرام به عنوان بیماری مرتبط با تجمع پروتئین‌ها شناخته نمی‌شود [۳۷]. از آنجا که یکی از جهش‌هایی که در بخش انتهایی پروتئین رخ می‌دهد (F883X) می تواند منجر به تخریب ولفرامین شود، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که هرگونه جهش مرتبط با بیماری می‌توان برای حفظ تمامیت پروتئین خطرآفرین باشد.

البته این نتیجه گیری یک فرضیه است و باید در ارتباط با آن شواهد بیشتری بدست آید، ولیکن این مزیت را دارد که پلی مورفیسم های متداول را از جهش های بیماریزا جدا می نماید: می توان فرض کرد که تاثیر هیچ کدام از پلی مورفیسم های متداول روی ساختار پروتئین منجر به تخریب آن از طریق سازوکارهای محافظتی سلولی نمی شود. البته باید این موضوع را باید با احتیاط مطرح کرد زیرا ارتباط بین برخی از انواع متداول تغییرات پروتئین با برخی علایم سندرم ولفرام نظیر دیابت گزارش شده است [۲۰،۲۱]. در مطالعه حاضر، یکی از پلی مورفیسم های یافت شده (W588G) می تواند با اهمیت باشد، زیرا در بیمار ۶ مشاهده شده است که علائم بیماری در وی شدید است.

ساختمان پروتیئن ولفرامین هنوز به طور کامل شناسایی نشده است.شواهدی وجود دارد که کمبود آن منجر به اختلال در عملکرد سلول‌های بتای پانکراس و سلول‌های عصبی می‌شود ولی تأثیر واقعی موتاسیون‌های متفاوت در آن مشخص نیست. درک کامل این موارد نیاز به بررسی و تحقیقات بیشتری دارد.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر با حمایت مالی پژوهشکده علوم غدد و متابولسیم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است. پژوهشگران بر خود لازم می‌دانند از جناب آقای دکتر لاریجانی ریاست محترم پژوهشکده تشکر نمایند.

مأخذ

1. Barrett TG, Bundey SE, Macleod AF Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Lancet* 1995 ;346:1458-1463.
2. Barrett TG, Bundey SE Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *J Med Genet* 1997;34:838-841.
3. Hardy C, Khanim F, Torres R, Scott-Brown M, Seller A, Poulton J, et al. Clinical and molecular genetic analysis of 19 Wolfram syndrome kindreds demonstrating a wide spectrum of mutations in WFS1. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 1279-1290.
4. Zenteno JC, Ruiz G, Perez-Cano HJ, Camargo M Familial Wolfram syndrome due to compound heterozygosity for two novel WFS1 mutations. *Mol Vis* 2008;14:1353-1357.
5. Nickl-Jockschat T, Kunert HJ, Herpertz-Dahlmann B, Grozinger M Psychiatric symptoms in a patient with Wolfram syndrome caused by a combination of thalamic deficit and endocrinological pathologies. *Neurocase* 2008; 15: 47-52.
6. Swift RG, Polymeropoulos MH, Torres R, Swift M Predisposition of Wolfram syndrome heterozygotes to psychiatric illness. *Mol Psychiatry* 1998;3:86-91.
7. Colosimo A, Guida V, Rigoli L, Di Bella C, De Luca A, Briuglia S, et al. Molecular detection of novel WFS1 mutations in patients with Wolfram syndrome by a DHPLC-based assay. *Hum Mutat* 2003;21:622-629.

8. Fraser FC, Gunn T Diabetes mellitus, diabetes insipidus, and optic atrophy. An autosomal recessive syndrome? *J Med Genet* 1977; 14: 190-193.
9. Kinsley BT, Swift M, Dumont RH, Swift RG Morbidity and mortality in the Wolfram syndrome. *Diabetes Care* 1995;18:1566-1570.
10. Inoue H, Tanizawa Y, Wasson J, Behn P, Kalidas K, Bernal-Mizrachi E, et al. A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nat Genet* 1998; 20:143-148.
11. Smith CJ, Crock PA, King BR, Meldrum CJ, Scott RJ Phenotype-genotype correlations in a series of wolfram syndrome families. *Diabetes Care* 2004;27:2003-2009.
12. Strom TM, Hortnagel K, Hofmann S, Gekeler F, Scharfe C, Rabl W,et al. Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 2021-2028.
13. Hofmann S, Philbrook C, Gerbitz KD, Bauer MF Wolfram syndrome: structural and functional analyses of mutant and wild-type wolframin, the WFS1 gene product. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 2003-2012.
14. Osman AA, Saito M, Makepeace C, Permutt MA, Schlesinger P, Mueckler M Wolframin expression induces novel ion channel activity in endoplasmic reticulum membranes and increases intracellular calcium. *J Biol Chem* 2003; 278:52755-52762.
15. Schroder M Endoplasmic reticulum stress responses. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:862-894.
16. Fonseca SG, Fukuma M, Lipson KL, Nguyen LX, Allen JR, Oka Y, et al. WFS1 is a novel component of the unfolded protein response and maintains homeostasis of the endoplasmic reticulum in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 2005; 280:39609-39615.
17. Takeda K, Inoue H, Tanizawa Y, Matsuzaki Y, Oba J, Watanabe Yet al. WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 477-484.
18. Bespalova IN, Van Camp G, Bom SJ, Brown DJ, Cryns K, DeWan AT, et al. Mutations in the Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) are a common cause of low frequency sensorineural hearing loss. *Hum Mol Genet* 2001;10:2501-2508.
19. Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Inoue I, Abe T, et al. Missense variations of the gene responsible for Wolfram syndrome (WFS1/wolframin) in Japanese: possible contribution of the Arg456His mutation to type 1 diabetes as a nonautoimmune genetic basis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 268:612-616.
20. Sandhu MS, Weedon MN, Fawcett KA, Wasson J, Debenham SL, Daly A,et al. Common variants in WFS1 confer risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2007;39:951-953.
21. Franks PW, Rolandsson O, Debenham SL, Fawcett KA, Payne F, Dina C, et al. Replication of the association between variants in WFS1 and risk of type 2 diabetes in European populations. *Diabetologia* 2008;51:458-463.
22. Viswanathan V, Medempudi S, Kadiri M Wolfram syndrome. *J Assoc Physicians India* 2008; 56:197-199.
23. Domenech E, Kruyer H, Gomez C, Calvo MT, Nunes V First prenatal diagnosis for Wolfram syndrome by molecular analysis of the WFS1 gene. *Prenat Diagn* 2004;24:787-789.
24. Medlej R, Wasson J, Baz P, Azar S, Salti I, Loiselet J, et al. Diabetes mellitus and optic atrophy: a study of Wolfram syndrome in the Lebanese population. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1656-1661.
25. Bernsel A, Viklund H, Hennerdal A, Elofsson A TOPCONS: consensus prediction of membrane protein topology. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: W465-468.
26. Hirokawa T, Boon-Chieng S, Mitaku S SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 1998; 14:378-379.
27. Pasquier C, Promponas VJ, Palaios GA, Hamodrakas JS, Hamodrakas SJ A novel method for predicting transmembrane segments in proteins based on a statistical analysis of the SwissProt database: the PRED-TMR algorithm. *Protein Eng* 1999; 12:381-385.
28. Tusnady GE, Simon I The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* 2001;17:849-850.
29. Arinaminpathy Y, Khurana E, Engelman DM, Gerstein MB Computational analysis of membrane proteins: the largest class of drug targets. *Drug Discov Today* 2009; 14:1130-1135.
30. Torres R, Leroy E, Hu X, Katrivanou A, Gourzis P, Papachatzopoulou A, et al., Mutation screening of the Wolfram syndrome gene in psychiatric patients. *Mol Psychiatry* 2001; 6:39-43.
31. Cryns K, Sivakumaran TA, Van den Ouweland JM, Pennings RJ, Cremers CW, Flothmann K, Young TL, et al. Mutational spectrum of the WFS1 gene in Wolfram syndrome, nonsyndromic hearing impairment, diabetes mellitus, and psychiatric disease. *Hum Mutat* 2003; 22: 275-287.
32. Zatyka M, Ricketts C, da Silva Xavier G, Minton J, Fenton S, Hofmann-Thiel S, et al. Sodium-potassium ATPase 1 subunit is a molecular partner of Wolframin, an endoplasmic reticulum protein involved in ER stress. *Hum Mol Genet* 2008; 17:190-200.
33. Zalloua PA, Azar ST, Delepine M, Makhoul NJ, Blanc H, Sanyoura M, et al. WFS1 mutations are frequent monogenic causes of juvenile-onset

diabetes mellitus in Lebanon. *Hum Mol Genet* 2008;17:4012-4021.
34. Sam W, Qin H, Crawford B, Yue D, Yu S Homozygosity for a 4-bp deletion in a patient with Wolfram syndrome suggesting possible phenotype and genotype correlation. *Clin Genet* 2001; 59: 136-138.
35. d'Annunzio G, Minuto N, D'Amato E, de Toni T, Lombardo F, Pasquali L, et al. Wolfram syndrome (diabetes insipidus, diabetes, optic atrophy, and deafness): clinical and genetic study. *Diabetes Care* 2008; 31:1743-1745.
36. Cano A, Rouzier C, Monnot S, Chabrol B, Conrath J, Lecomte P, et al. Identification of novel mutations in WFS1 and genotype-phenotype correlation in Wolfram syndrome. *Am J Med Genet A* 2007; 143A:1605-1612.
37. Hofmann S, Bauer MF Wolfram syndrome-associated mutations lead to instability and proteasomal degradation of wolframin. *FEBS Lett* 2006 ; 580:4000-4004.