

Wolfram 综合征一家系的临床及遗传学分析

陈子杰¹, 毛禹凯², 樊宁³, 洪燕芬¹, 刘旭阳¹

引用:陈子杰,毛禹凯,樊宁,等. Wolfram 综合征一家系的临床及遗传学分析. 国际眼科杂志 2023;23(11):1930-1934

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 82070963, 82271087);深圳市科技计划项目(No. JCYJ20190807153005579)

作者单位:¹(361000)中国福建省厦门市,厦门大学附属厦门眼科中心;²(350122)中国福建省福州市,福建医科大学医学技术与工程学院;³(518040)中国广东省深圳市眼科医院暨南大学附属深圳眼科医院

作者简介:陈子杰,在读硕士研究生,研究方向:青光眼。

通讯作者:刘旭阳,博士,主任医师,教授,博士研究生导师,研究方向:青光眼. xliu1213@126.com

收稿日期:2023-06-05 修回日期:2023-09-22

摘要

目的:研究由 WFS1 基因突变所导致的常染色体隐性遗传 Wolfram 综合征的临床特征和遗传学背景。

方法:应用临床检查,基因分析和生物信息学方法研究一常染色体隐性遗传 Wolfram 综合征家系。

结果:发现先证者及哥哥患糖尿病、色弱及视神经病变,此外其兄患尿崩症。全外显子组分析显示在兄弟二人的 WFS1 基因 8 号外显子存在两种杂合变异,即 c.941G>A (p.W314X) 和 c.2309T>G (p.F770C),并在该家系中与临床表型共分离。

结论:WFS1 基因的复合杂合突变与该家系 Wolfram 综合征相关,其中 c.941G>A (p.W314X) 尚未见报道。

关键词:Wolfram 综合征;WFS1 基因;遗传学分析;突变

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2023.11.32

Clinical and genetic analysis of a pedigree with Wolfram syndrome

Zi-Jie Chen¹, Yu-Kai Mao², Ning Fan³, Yan-Fen Hong¹, Xu-Yang Liu¹

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 82070963, 82271087); Shenzhen Science and Technology Plan Program (No. JCYJ20190807153005579)

¹Xiamen Eye Center of Xiamen University, Xiamen 361000, Fujian Province, China; ²School of Medical Technology and Engineering, Fujian Medical University, Fuzhou 350122, Fujian Province, China; ³Shenzhen Eye Hospital, Jinan University, Shenzhen 518040, Guangdong Province, China

Correspondence to: Xu-Yang Liu. Xiamen Eye Center of Xiamen

University, Xiamen 361000, Fujian Province, China. xliu1213@126.com

Received:2023-06-05 Accepted:2023-09-22

Abstract

• AIM: To investigate the clinical features and genetic background of autosomal recessive Wolfram syndrome caused by WFS1 gene mutation.

• METHODS: A pedigree with autosomal recessive Wolfram syndrome was studied by clinical examination, gene analysis and bioinformatics.

• RESULT: It was found that the proband and his brother had diabetes, color weakness and optic neuropathy. In addition, his brother had diabetes insipidus. Whole-exome sequencing (WES) analysis showed that there were two heterozygous variations in the WFS1 gene exon 8 of the two brothers: c.941G>A (p.W314X) and c.2309T>G (p.F770C), and were co-separated from the clinical phenotype in this family.

• CONCLUSION: The compound heterozygous mutation of WFS1 gene is associated with Wolfram syndrome in this pedigree. Among them, c.941G>A (p.W314X) has not been reported yet.

• KEYWORDS: Wolfram syndrome; WFS1 gene; genetic analysis; mutation

Citation: Chen ZJ, Mao YK, Fan N, et al. Clinical and genetic analysis of a pedigree with Wolfram syndrome. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2023;23(11):1930-1934

0 引言

Wolfram 综合征 (Wolfram syndrome, WS) 是一种罕见的常染色体隐性遗传性疾病,主要特征是青少年糖尿病 (diabetes mellitus, DM)、视神经萎缩 (optic atrophy, OA)、耳聋 (sensorineural hearing loss, D)、尿崩症 (diabetes insipidus, DI),所以又称为 DIDMOAD 综合征。有研究者分析了 412 例 Wolfram 综合征患者的临床及遗传学研究资料,发现 98.2% 的患者患有糖尿病,82.1% 的患者患有视神经萎缩,而出现耳聋或尿崩症的仅有 40%^[1]。该病发病率在不同的种族群体间为 1/770000~1/54478^[2],前期研究表明与 Wolfram 综合征有关的两个致病基因,即位于 4p16.1 上的 WFS1 基因和位于 4q22-4q24 上的 CISD2 基因。前者编码 wolframin 跨膜蛋白,后者则编码 Miner1 蛋白^[3]。由于 Wolfram 综合征起病隐匿,基因型和临床表型之间的关联尚不完全明确,故当前并无针对性的疗法。该病的诊断目前主要依靠临床表现,且利用基因测序可早期识别该综合征,并及时干预,改善预后,对后代的遗传咨询和产前诊断也有重要意义。本研究通过全外显子组测序 (whole exome sequencing, WES) 的方法,讨论 1 个常染色

体隐性遗传 WS 家系 WFS1 基因的复合杂合变异,并进行临床表型及分子遗传学分析。

1 对象和方法

1.1 对象 于 2022-12 在厦门大学附属厦门眼科中心收集一个 2 代 3 例中国家庭成员的 Wolfram 综合征家系信息。本研究遵循《赫尔辛基宣言》且通过伦理与道德委员会批准,所有检测方法均征得患者及家属知情同意并签署同意书。

1.2 方法 对所有患者进行详细的病史询问和眼部检查,包括视力、眼压、眼底检查、视野、视觉诱发电位 (VEP) 等检查明确临床诊断。告知先证者及家属基因测序。采取先证者及其母亲 5mL 全血,采取其兄的口腔黏膜。从样本中获得基因组 DNA,对先证者进行全外显子组检测。利用探针杂交捕获目标基因外显子及毗邻剪接区域,使用高通量测序仪检测。去除不符合条件的内容,比对 UCSC 提供的 hg38 版本人类基因组参考序列。通过 HaplotypeCaller 寻找其中的突变位点。使用 xhmm 和 clamms 算法对探针覆盖区进行高拷贝数突变解析。用 Polyphen-2, VarSite 在线网站分析基因变异引起的蛋白质结构和功能变化。根据常染色体隐性遗传或复合杂合遗传模式,筛选家系的外基因组测序数据。过滤后得到同一基因的纯合变异体和两个或两个以上杂合变异体。依据美国医学遗传学和基因组学学会 (ACMG) 遗传变异分类标准与指南来解释序列变异部分,获得该家系的

候选基因和变异体的信息^[4]。

2 结果

2.1 先证者及其哥哥的临床检查结果 先证者,男性,31 岁。因“双眼视力下降 5a”就医。经检查发现右眼裸眼视力 0.03,矫正视力 $-5.25DS/-1.00DC \times 180 = 0.1$;左眼裸眼视力 0.04,矫正视力 $-5.25DS/-1.50DC \times 180 = 0.3$ 。右眼瞳孔对光反应略迟钝。双眼视盘色白,右眼杯盘比 0.9,左眼杯盘比 0.8。余双眼检查无明显异常。VEP 检查提示右眼 P100 潜伏期重度延迟,P100 波幅中度降低;左眼 P100 潜伏期中度延迟,P100 波幅中度降低,见图 1。既往史:7 岁时发现有色弱。25 岁配镜后视力无法矫正到正常水平。30 岁于体检时发现血糖 10mmol/L,随后诊断为糖尿病,服用双胍类药物可控制血糖。听力无异常。

先证者哥哥,39 岁。右眼裸眼视力 1.0,矫正视力 $-0.75DC \times 5 = 1.0$;左眼裸眼视力 1.0,矫正视力 1.0。右眼杯盘比 0.6,左眼杯盘比 0.5。VEP 检查提示右眼 P100 波幅重度降低;左眼 P100 波幅中度降低。视野检查发现右眼平均缺损 $-4.11dB$,左眼平均缺损 $-4.55dB$ 。余双眼检查无明显异常,见图 1。既往史:19 岁时感到夜尿多并一直持续到现在。29 岁时因“多饮、多尿、体质量减轻”就医,诊断为糖尿病,通过服用双胍类药物和注射长效胰岛素控制血糖。无听力损伤。

家族史:父亲已去世。母亲无糖尿病、色弱、视力减退。否认近亲婚配。

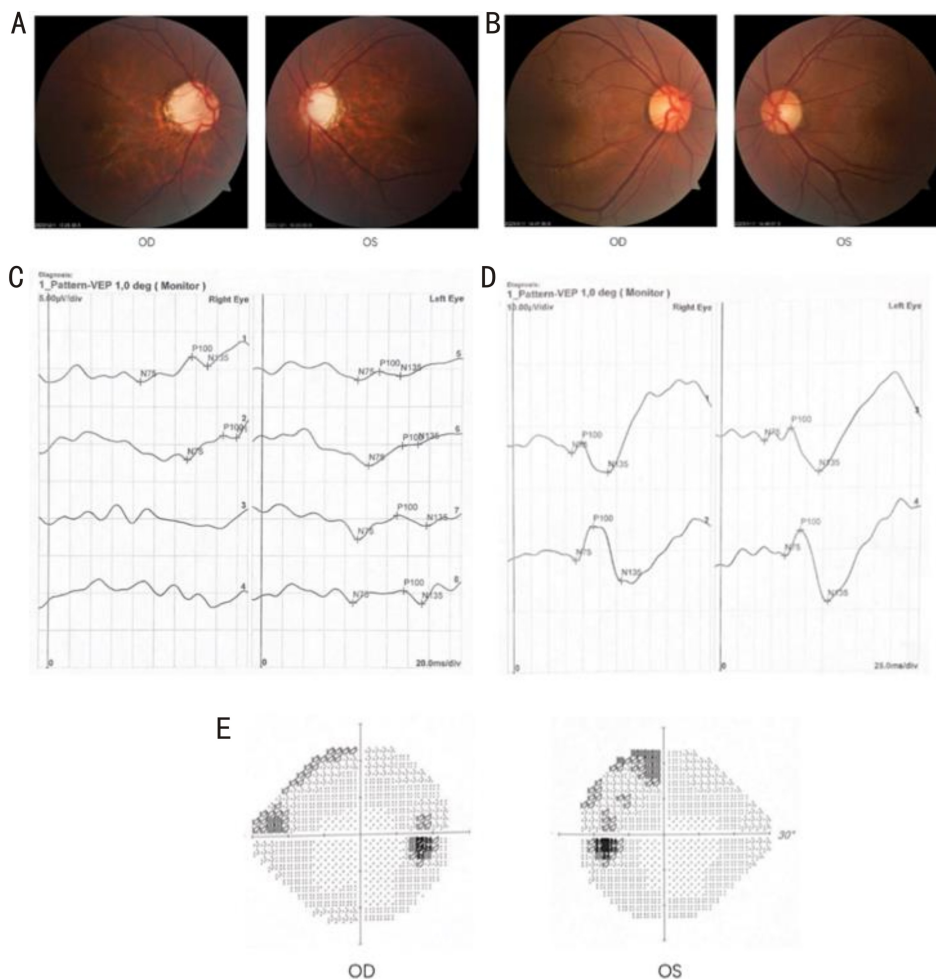


图 1 先证者及其哥哥的眼部检查结果 A:先证者眼底照相可见双眼视盘色苍白,杯盘比大;B:先证者哥哥的眼底照相;C:先证者视觉诱发电位,振幅及频率降低;D:先证者哥哥的视觉诱发电位,振幅及频率降低;E:先证者哥哥的视野检查,可见双眼均有少许视野缺损。

2.2 先证者及其哥哥的基因检测结果 兄弟二人的 WFS1 基因 8 号外显子上均发现两种杂合变异: c.941G>A (p.W314X) 和 c.2309T>G (p.F770C)。前者 gnomAD 东亚人群数据库收录为 0, 未有文献报道, 为新发现的无义变异; 后者已有作者发现并报道过 WS 相关错义变异^[5]。Sanger 测序发现先证者母亲只检测到 c.2309T>G (p.F770C) 变异, 另一个位点为野生型, 见图 2。

根据美国医学遗传学和基因组学学会 (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) 指南, 这两个变异位点均被认为是“意义不明确的”, 支持致病性证据包括: (1) PM2: ESP 数据库、千人数据库、EXAC 数据库中正常对照人群中未发现的变异; (2) PP1: 突变与疾病在家系中共分离; (3) PP3: 多种统计方法预测出该变异会对基因或基因产物造成有害的影响。

生物信息学分析: 预测软件 Mutation Taster 预测这两个变异位点均是致病的。Polyphen-2 将 p.F770C 变异列为“可能具有破坏性”, 评分 1.0。第 314 位的色氨酸残基

保守 (不同生物体蛋白序列中保守值 = 0.8, 表明它对蛋白质的功能有重要意义); 相比之下第 770 位的苯丙氨酸残基相对保守 (不同生物体蛋白序列中保守值 = 0.7, 其改变可能不会引起蛋白质功能明显改变, 图 3)。

3 讨论

Wolfram 综合征临床表现错综复杂, 主要包括以下几种: (1) 初发症状多为学龄前期或学龄期发生的糖尿病; (2) 随后为学龄期左右出现的视神经萎缩, 部分患者可伴色觉障碍; (3) 高频段受累严重的感音性耳聋; (4) 中枢性尿崩症。其他少见的症状有: 胃肠道不适、部分腺体功能减退如性腺、甲状腺、智力或发育迟缓、先天性心脏病等^[6]。但并不是所有 Wolfram 综合征患者都会出现这 4 个典型表型, 或者是表型出现的先后顺序不是固定不变的。比如在一项对 8 个纯合子的研究报告中, 患者诊断为糖尿病的平均年龄为 18 岁, 而且仅有 1 例患者出现视神经萎缩, 或者有报道部分患者在三十岁左右才被诊断为糖尿病和视神经萎缩^[7-8]。

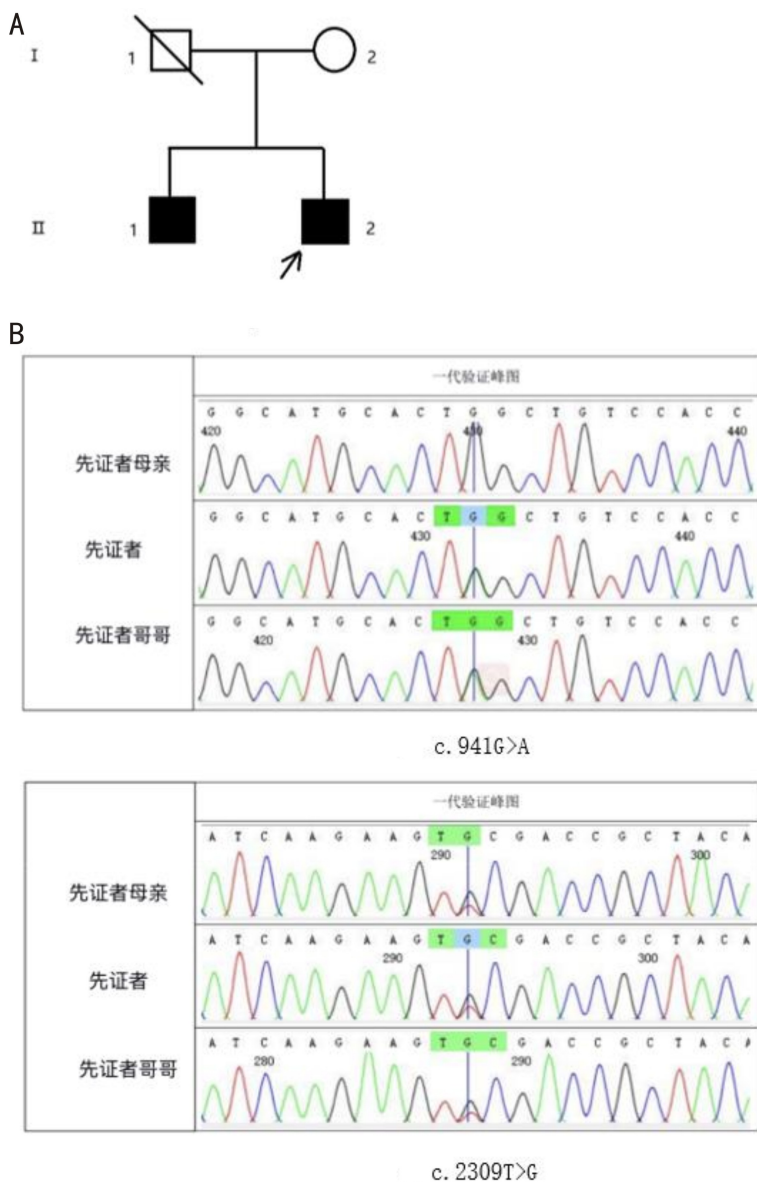


图 2 WFS1 变异的 WF 家系和 WFS1 基因的 Sanger 测序结果 A: 研究中 WFS1 谱系。圆形符号表示女性个体; 方形符号表示男性个体; 黑色符号表示 WF 患者; 箭头标记表示先证者; B: WF 家系 WFS1 基因的 Sanger 测序验证。可见先证者和其兄均存在两个位点的变异。母亲只存在一个位点变异。

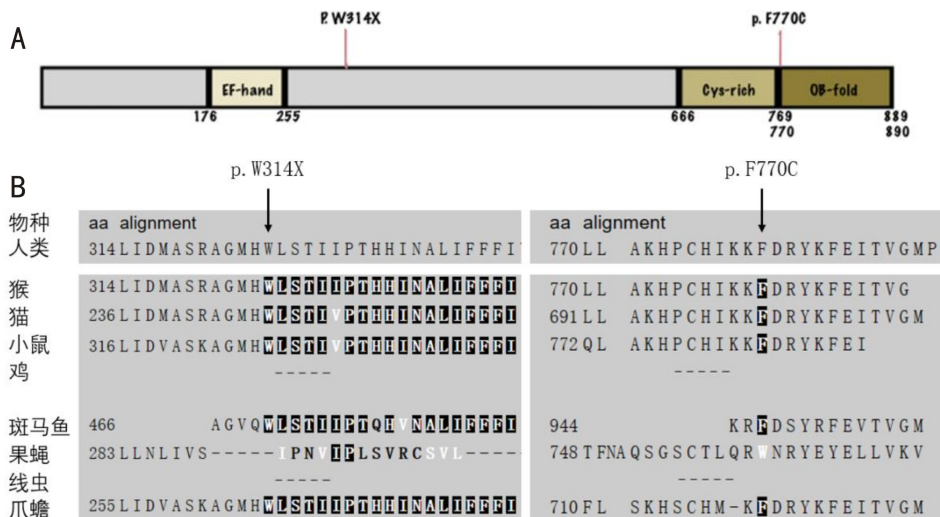


图3 WF家系中WFS1变异的生物信息学分析 A: wolframin蛋白结构域及本研究中的变异位点(域名参考Pfam数据库); B: wolframin蛋白在不同物种间的序列对比。黑色箭头表示变异氨基酸。

本例先证者以色弱、视力下降为首发症状。早期仅诊断为屈光不正,当配镜无法提高视力时前来就诊,经检查诊断为视神经病变。其糖尿病由正常体检时发现,此前无糖尿病相关症状,服用双胍类药物控制稳定。其兄以夜尿增多、尿崩症为首发症状。随后发现有糖尿病,使用长效胰岛素联合双胍类药物血糖控制好。多尿表现一直持续到现在。尽管视力正常,但视觉诱发电位及视野检查显示仍存在视神经病变。

兄弟二人无感染性疾病史,无视力急性下降病史,视野无中心暗点,眼底视乳头无充血水肿、无毛细血管扩张,可排除视神经炎。眼底检查记录未发现新生血管,未见视网膜微动脉瘤及出血渗出,可排除糖尿病导致的眼底及视神经的病变。基因检测发现二人的WFS1基因突变,未发现OPA1基因和线粒体突变,也可排除Leber遗传性视神经病变。因此,根据二人的基因检测结果,相关临床表型,并排除了可能会出现的其他疾病后,均可以确定为Wolfram综合征。

根据文献报道,一些Wolfram综合征的青少年患者仅表现为糖尿病,并且通常被误诊为1型或2型糖尿病,患者使用一些糖尿病药物,如胰高血糖素样肽1受体激动剂(GLP-1RAs)和双胍类药物,可以缓解胰岛细胞内质网应激,延缓糖尿病进展^[9-10]。这与本文中的2例患者相似。本文2例患者均是在20岁之后被诊断为糖尿病,因此我们认为WFS1基因突变导致的糖尿病与传统的1型糖尿病相比存在一些差异。WS相关性糖尿病不是由胰岛β细胞功能缺陷引起的,而是由内质网应激介导的β细胞破坏,突变的wolframin激活胰岛β细胞内质网应激反应和未折叠蛋白反应(UPR),导致细胞周期进展受损和细胞凋亡^[11]。患者通常自身抗体阳性率低,其起病隐匿、临床表现轻、进展慢、不易发生酮症酸中毒、急性和慢性并发症少,且使用胰岛素联合口服降糖药物后控制好,因此WS相关性糖尿病的表型有时是非典型的,可能会被误诊为2型糖尿病。所以在出现自身免疫性糖尿病抗体阴性合并其他相关临床症状时可以进行遗传学分析^[12]。本文患者的糖尿病表现也和其基因型有关。在另一项包括

82例诊断为1型糖尿病患者,有4例(4.9%)携带WFS1纯合或复合杂合变异,这4例患者除了糖尿病外,没有出现其他Wolfram综合征表型;且他们使用双胍类药物可以良好的控制血糖,这与本文患者相同^[10]。

本文的2例患者目前并没有出现听力障碍,这与基因型有关。一项包含68例Wolfram综合征患者的研究显示只有80.89%的患者会出现听力障碍,其中有77%的患者出现重度听力损失,他们是由于WFS1基因第8外显子或第4外显子的纯合突变导致的;相反,那些听力正常或受到轻微影响的人有90%是杂合突变,因此Esteban-Bueno等^[13]认为纯合基因突变的患者更有可能出现听力损害或听力缺失更严重。

Wolfram综合征是由WFS1或CISD2基因变异引起的。前者突变导致Wolfram综合征1型;后者则导致2型^[3],且1型更为多见。WFS1基因位于4p16.1上,由8个外显子组成,编码wolframin蛋白。wolframin蛋白是一种嵌入内质网的蛋白质,在胰腺β细胞、心、肺、脑组织中广泛表达,由于内质网在蛋白质折叠中发挥重要作用,WFS1中的致病变异导致错误折叠蛋白的积累,最终导致细胞凋亡^[7]。目前已报道的致病性变异大部分位于WFS1的第8外显子,因为该外显子编码wolframin蛋白的跨膜和c端结构域,这是该蛋白重要的功能结构^[14]。CISD2定位于4q24,由3个编码NAF-1蛋白的外显子组成,编码Miner1蛋白。

当前遗传学研究已发现WFS1中有200多种致病变异,且在WFS1基因中呈不均匀分布。有学者认为疾病出现的时间、程度、发展变化可能与基因变异的位置及种类存在关系。比如错义变异,是由于碱基替换使原氨基酸变为另一种,导致wolframin蛋白轻微降解,引起的临床表型较轻;或无义变异,是由于终止密码子的提前出现而合成不完整的肽链以及移码突变,由于某位点的碱基插入或缺失使下游一串密码子改变从而合成另一种肽链。两者均可导致wolframin蛋白的完全耗竭,所引起的临床表现可能较重^[15]。日本学者对Wolfram综合征患者WFS1突变的基因型-表型相关性的研究表明,WFS1突变可以根据

临床表型严重程度分为两组,其中无义突变、移码突变和/或两个等位基因中多个氨基酸插入/缺失的变异比错义突变和/或两个等位基因中单个氨基酸插入的变异更严重^[16]。

本文兄弟二人的 WFS1 基因上均检测到第 8 号外显子存在 c.941G>A(p.W314X) 和 c.2309T>G(p.F770C) 杂合变异,通过家系验证符合常染色体隐性遗传模式。其中 c.2309T>G(p.F770C) 是已发表的 Wolfram 综合征基因变异,为错义变异。该变异使得原苯丙氨酸突变为半胱氨酸,导致原蛋白质的编码错误而使功能缺失。该位点在一个 Wolfram 综合征家系中以复合杂合的形式被查出,文献中的患者是存在 c.1522_1523delTA(p.Tyr508Cysfs * 34) 和 c.2309T>G(p.F770C) 的复合杂合突变,且 c.2309T>G(p.F770C) 也是来自于母亲,该患者与本文中的两位患者在视力、眼底、视觉诱发电位的表现均相似,比如矫正视力差、VEP 波形延迟、轻微视野缺损等,且都没有听力损害^[5]。本文中的另一个变异 c.941G>A(p.W314X) 为新发现的一个变异,该变异为一种无义变异,使原色氨酸密码子变成了终止密码子,导致多肽链的合成到此停止,产生了一条不完整的肽链,改变蛋白质的功能。查阅有关文献并未报道过这种变异。但有文献中描述过 1 例由 c.940T>C(p.Trp314Arg) 杂合突变导致的 Wolfram 综合征。该突变与本文的第二个突变位点相似,改变的都是第 314 位的色氨酸。但不同的是,本文患者的突变是由色氨酸密码子变成了终止密码子,翻译终止,而文献中是由色氨酸突变为精氨酸,下游的密码子还可以继续翻译。该研究者认为 p.Trp314Arg 这个改变似乎降低了 WFS1 抵抗内质网应激的能力,这可能会随着时间的推移损害 β 细胞的功能,导致相对胰岛素不足和糖尿病的发生^[9]。先证者母亲只检测到 c.2309T>G(p.F770C) 杂合变异,另一个位点为野生型。由此可知,兄弟二人的 c.2309T>G(p.F770C) 杂合变异由其母亲传下来,而 c.941G>A(p.W314X) 杂合突变可能是由其父亲传下来。该家系中先证者及其哥哥被诊断为 Wolfram 综合征,先证者母亲为 c.2309T>G(p.F770C) 杂合携带者,临床表型与基因型共分离。

综上所述,本研究在一个常染色体隐性遗传 WS 家系中检测出 WFS1 基因的 c.941G>A(p.W314X) 和 c.2309T>G(p.F770C) 杂合变异。前者尚未报道,丰富了 WFS1 基因变异谱。Wolfram 综合征临床表现复杂,诊断较为困难。因此,对于一些无法查明原因的视神经萎缩合并有糖尿病、听力障碍、尿崩症等相关症状之一的患者,均应该考虑是否为 Wolfram 综合征,可做基因检测来进一步明确诊断。Wolfram 综合征的基因变异对临床表现的影响较为复杂,需要长期的探索研究来寻找它们之间的关系,为能够早期的诊断以及治疗奠定基础。

参考文献

- 1 de Heredia ML, Clèries R, Nunes V. Genotypic classification of patients with Wolfram syndrome: insights into the natural history of the disease and correlation with phenotype. *Genet Med* 2013;15(7):497-506
- 2 Barrett TG, Bunday SE, Macleod AF. Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Lancet* 1995;346(8988):1458-1463
- 3 Delvecchio M, Iacoviello M, Pantaleo A, et al. Clinical spectrum associated with wolfram syndrome type 1 and type 2: a review on genotype-phenotype correlations. *Int J Environ Res Public Health* 2021;18(9):4796
- 4 Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17(5):405-424
- 5 Wang DD, Hu FY, Gao FJ, et al. The precise diagnosis of wolfram syndrome type 1 based on next-generation sequencing. *Front Genet* 2019;10:1217
- 6 Urano F. Wolfram syndrome: diagnosis, management, and treatment. *Curr Diab Rep* 2016;16(1):6
- 7 Jauregui R, Abreu NJ, Golan S, et al. Neuro-ophthalmologic variability in presentation of genetically confirmed wolfram syndrome: a case series and review. *Brain Sci* 2023;13(7):1030
- 8 Bansal V, Boehm BO, Darvasi A. Identification of a missense variant in the WFS1 gene that causes a mild form of Wolfram syndrome and is associated with risk for type 2 diabetes in Ashkenazi Jewish individuals. *Diabetologia* 2018;61(10):2180-2188
- 9 Bonnycastle LL, Chines PS, Hara T, et al. Autosomal dominant diabetes arising from a Wolfram syndrome 1 mutation. *Diabetes* 2013;62(11):3943-3950
- 10 Li MH, Wang SH, Xu KF, et al. High prevalence of a monogenic cause in Han Chinese diagnosed with type 1 diabetes, partly driven by nonsyndromic recessive WFS1 mutations. *Diabetes* 2020;69(1):121-126
- 11 Ishihara H, Takeda S, Tamura A, et al. Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive β -cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. *Hum Mol Genet* 2004;13(11):1159-1170
- 12 Iafusco D, Zanfardino A, Piscopo A, et al. Metabolic Treatment of Wolfram Syndrome. *Int J Environ Res Public Health* 2022;19(5):2755
- 13 Esteban-Bueno G, Berenguel Hernández AM, Fernández Fernández N, et al. Neurosensory affection in patients affected by wolfram syndrome: descriptive and longitudinal analysis. *Healthcare* 2023;11(13):1888
- 14 Rigoli L, Caruso V, Salzano G, et al. Wolfram syndrome 1: from genetics to therapy. *Int J Environ Res Public Health* 2022;19(6):3225
- 15 Rigoli L, Aloisi C, Salina A, et al. Wolfram syndrome 1 in the Italian population: genotype-phenotype correlations. *Pediatr Res* 2020;87(3):456-462
- 16 Matsunaga K, Tanabe K, Inoue H, et al. Wolfram syndrome in the Japanese population; molecular analysis of WFS1 gene and characterization of clinical features. *PLoS One* 2014;9(9):e106906