

بررسی ژنتیکی چاقی مفرط خانوادگی ناشی از جهش طبیعی در مولکول گیرنده پپتین و مدل سازی تغییرات ساختار فضایی گیرنده در اثر جهش

دکتر آرش بابایی^۱، دکتر سید حمید زرکش اصفهانی^۲، دکتر سید جمال مشتاقیان^۲

خلاصه

مقدمه: چاقی به عنوان یک معضل جهانی، یک نوع اختلال با عوامل متعدد محسوب می‌شود؛ این عوامل می‌تواند شامل عوامل محیطی، متابولیک و ژنتیک باشد. بر اساس نتایج تحقیقات و مطالعات ژنتیک در دهه‌های اخیر، انواع جهش‌های مختلف در جایگاه‌های متفاوت کروموزومی برای این اختلال کشف گردیده است. پپتین یکی از مهم‌ترین هورمون‌های مترشحه‌ی بافت چربی با نقش محوری در تنظیم ثبات انرژی و متابولیسم از طریق اشتها و گرسنگی است. این هورمون به گیرنده‌ی خود در سطح بسیاری از سلول‌های بدن، به خصوص در ناحیه‌ی هسته‌ی و نترومدیال هیپوتالاموس معروف به مرکز اشتها، متصل می‌شود که می‌تواند دامنه‌های علامت دهی درون سلولی را فعال کند. گروه کوچکی از انسان‌ها که در آن‌ها جهش در ژن تولید گیرنده‌ی پپتین صورت گرفته است و در نتیجه نسبت به پپتین مقاوم می‌باشند، دارای اشتیاق پایداری برای غذا هستند که این مسأله منجر به ایجاد چاقی مفرط می‌گردد.

روش‌ها: برای بررسی ژنتیکی چاقی مفرط خانوادگی ناشی از جهش در مولکول گیرنده‌ی پپتین، DNA گلوبول‌های سفید خون افراد مورد آزمایش در این پژوهش استخراج و مورد تعیین توالی قرار گرفت؛ سپس، ساختار فضایی متعارف احتمالی بر اساس مدل سازی سوئیسی قسمت‌هایی از بخش خارج سلولی گیرنده‌ی پپتین، که دچار جهش‌های طبیعی شده بود، مورد مقایسه با ساختار متعارف احتمالی سالم همان قسمت‌ها قرار گرفت.

یافته‌ها: در این پژوهش ما دو مورد خواهر جوان در یک خانواده‌ی روستایی کردی- ترکی نزدیک مرز ایران و ترکیه را که دچار دو جهش بد معنی شدن هموزیگوت در گیرنده‌ی پپتین شده بودند، معرفی نموده‌ایم. والدین آن‌ها برای هر دو جهش هتروزیگوت بودند.

نتیجه گیری: احتمال می‌رود، جهش‌های بد معنی شدن هموزیگوت تبدیل تریپتوفان به سیستئین در جایگاه ۶۴۶ و پرولین به ترئونین در جایگاه ۳۱۶ که به ترتیب در دامنه‌ی CRH1 و قسمت فیرونکتینی FNIII می‌باشد از طریق اختلال در سیگنال یا علامت دهی پپتین و ممانعت از فسفوریله شدن STAT3 باعث اشتهای دایم همراه سیری ناپذیری و چاقی مفرط بیماران مورد بررسی شده باشد.

واژگان کلیدی: چاقی مفرط، جهش بد معنی شدن هموزیگوت، گیرنده‌ی پپتین، مقایسه‌ی مدل سوئیسی.

مقدمه

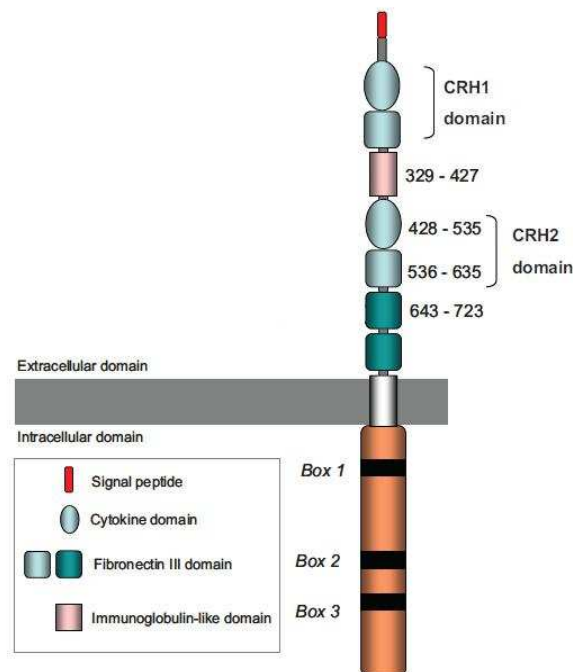
اثرات پپتین از طریق مطالعه روی موش‌های چاق جهش یافته‌ای که به طور اتفاقی در جمعیت‌های موش موجود در آزمایشگاه Jackson پیدا شده بود، مشاهده گردید. این گروه از موش‌ها بیش از حد چاق و پرخور بودند (۲)؛ اما خود پپتین در سال ۱۹۹۴ توسط Cohen و همکاران در دانشگاه Rockefeller با مطالعه‌ی گروه‌های مشابه موش‌ها کشف شد (۳). گیرنده‌ی پپتین، که با ژن db در

تاکنون بیش از ۲۰۰ ژن در موش‌ها و ۱۰۰ ژن در انسان‌ها تشخیص داده شده است که در تنظیم وزن بدن و فنوتیپ‌های مختلف چاقی مؤثر هستند. پپتین یکی از مهم‌ترین هورمون‌های مترشحه‌ی بافت چربی است که نقش کلیدی در تنظیم جذب و مصرف انرژی و یا به بیان دیگر، در اشتها و متابولیسم دارد (۱). در سال ۱۹۵۰،

^۱ استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران.

^۲ استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

ناشناخته نقش داشته باشد. گیرنده‌های مختلف لپتین در انواع مختلف سلول‌ها و بافت‌ها تشخیص داده شده است.



شکل ۱. قسمت‌های مختلف گیرنده‌ی لپتین در انسان

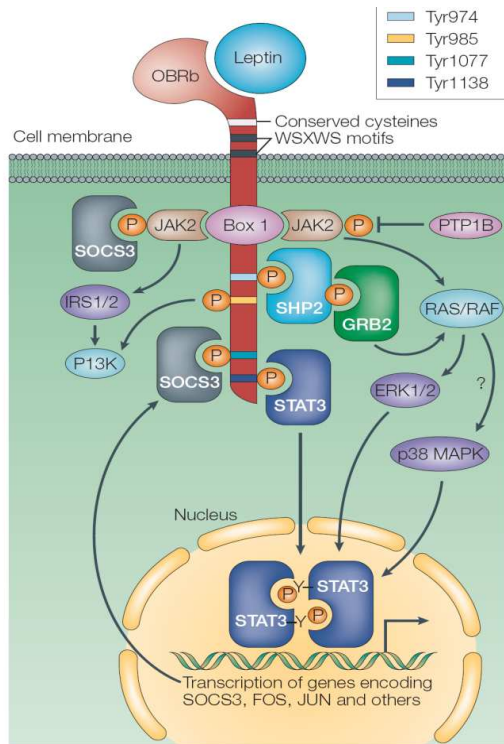
بخش خارج سلولی از ۷۲۳ اسید آمینه تشکیل شده که به ترتیب از دورترین قسمت نسبت به غشای سلولی شامل موارد زیر است: ۱- یک توالی ابتدایی با ۶۱ اسید آمینه که شامل محدوده‌ی پپتید علامت دهنده نیز می‌باشد (Signal peptide): ۲- محدوده‌ی اول همانند گیرنده‌ی سایتوکائینی (Cytokine receptor homology یا CRH-1) که با دو تحت دامنه‌ی تاخوردگی (Folds) تیپ III فیرونکتین (Fibronectin type III یا FNIII) شامل اسیدهای آمینه‌ی شماره‌ی ۶۲ تا ۱۷۸ و ۲۳۵ تا ۳۲۸ شکل گرفته است؛ ۳- تاخوردگی (Fold) شبه ایمنوگلوبولینی (Immunoglobulin like یا Ig-like) که شامل اسیدهای آمینه‌ی شماره‌ی ۳۲۹ تا ۴۲۷ می‌باشد؛ ۴- دو دامنه‌ی تاخوردگی FNIII که به ترتیب شامل اسیدهای آمینه‌ی شماره‌ی ۴۲۸ تا ۵۳۵ و اسیدهای آمینه‌ی شماره‌ی ۵۳۶ تا ۶۳۵ می‌باشد و تشکیل محدوده‌ی دوم همانند گیرنده‌ی سایتوکائینی (CRH 2) را می‌دهد؛ ۵- دو دامنه‌ی FNIII اضافه که شامل اسیدهای آمینه‌ی شماره‌ی ۶۳۶ تا ۷۲۳ می‌باشد؛ بخش میان غشایی شامل ۱۳۸ و بخش درون غشایی شامل ۳۰۴ اسید آمینه است (۱۴).

موش‌ها و ژن *fa* در رت‌ها بیان می‌شود، در انسان نیز بیان می‌گردد. علامت‌های انتقالی حاصل از لپتین، به مغز دستور کفایت غذا برای بدن و یا سیری را صادر می‌کند (۴). لپتین با شش نوع گیرنده (گیرنده‌ی لپتین a تا f) می‌تواند واکنش اتصالاتی برقرار کند. این شش ایزوفورم *a-f* گیرنده‌ی لپتین (ObR)، یک عضو از خانواده‌ی گیرنده‌های سایتوکائینی کلاس I است (۵) که در جریان بیان، در اثر تغییرات اتصالاتی (Alternative splicing) mRNA به شش نوع متفاوت، از نظر طولی و دامنه‌ی سیتوپلاسمی اما با دامنه‌های اتصالاتی خارج سلولی مشابه، تحت عنوان ObR_{a-f} تبدیل می‌شود (۶-۷)؛ این انواع شامل یک ایزوفورم بلند (ObRb)، چهار ایزوفورم کوتاه (ObRf و ObRd, ObRc, ObRa) و یک ایزوفورم ترشچی ObRe می‌باشند (۸-۹). تولید گیرنده‌ی لپتین توسط یک نوع ژن در کروموزوم ۱ انسان (۱۰) و ۴ موش (۴) صورت می‌گیرد که در سیستم دسته‌های تمایزی (Cluster of differentiation) CD₂₉₅ به آن اختصاص داده شده است (۱۱).

گیرنده‌ی لپتین نوع b که به عنوان فرم طویل ObR شناخته شده، تنها ایزوفورمی است که می‌تواند دامنه‌های علامت دهی درون سلولی را فعال کند (شکل ۱)؛ این گیرنده به وفور در هسته‌ی هیپوتالامیک یافت می‌شود. لپتین به هسته‌های و نترومدیال هیپوتالاموس که به مرکز اشتها معروف است، متصل می‌شود (۱۲). شواهد به دست آمده نشان می‌دهد که عملکرد گیرنده‌ی لپتین به عنوان یک تترامر از دو دی‌مر، که به وسیله‌ی سیستئین به هم متصل می‌باشد، تشکیل شده است (۱۳).

ایزوفورم کوتاه a گیرنده‌ی لپتین (ObRa) بایستی در انتقال لپتین از میان سد خونی-مغزی (Blood Brain Barrier یا BBB) و یا سایر فعالیت‌های

یا Adenosine monophosphate activated kinase) (AMPK انجام می‌دهد (۹).

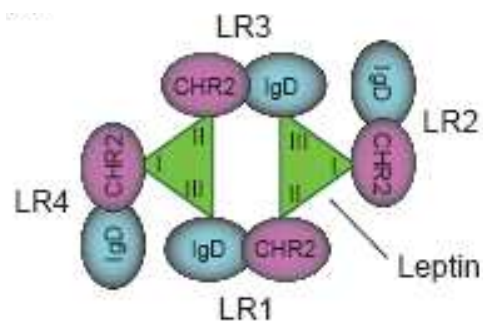


شکل ۳. مسیرهای انتقال سیگنال توسط گیرنده‌ی لپتین تا نتیجه‌ی نهایی تحریک که شامل دریافت غذا، متابولیسم اسیدهای چرب و سایر فعالیت‌های محیطی می‌باشد (۱۶).

روش‌ها

در تابستان سال ۱۳۸۵ خبری در جراید مبنی بر زندگی سخت دو خواهر ۱۷ و ۹ ساله به ترتیب با نام اختصاری «گ» به وزن ۲۰۰ کیلوگرم و «م» به وزن ۱۵۰ کیلوگرم در روستای صعب العبور «الف-س» از توابع یکی از شهرستان‌های استان آذربایجان غربی نزدیک به مرز ایران و ترکیه با نژاد کردی - ترکی به چاپ رسید که در آن، پدر پیر و از کارافتاده‌ی این خانواده هر گونه کمکی را از نهادهای امداد رسان برای درمان فرزندان خود خواستار شده بود. هر دوی این دخترها در موقع

ابتدا لپتین به دایمر گیرنده‌ی لپتین که از طریق پیوند دی سولفید به هم متصل است، وصل می‌شود. اتصال جایگاه I لپتین باعث اثر متقابل با دامنه‌ی CRH₂ اولین زنجیره‌ی گیرنده‌ی لپتین شده، اتصال جایگاه II اثر متقابل با دامنه‌ی CRH₂ دومین زنجیره‌ی گیرنده‌ی لپتین دارد (شکل ۲). در نهایت، فعال سازی گیرنده، به دی‌مریزه شدن تراپرها به نسبت ۲/۱ برای کمپلکس لپتین/گیرنده‌ی لپتین نیاز دارد. این هگزا مریزه شدن منجر به تأثیر متقابل اتصال جایگاه III مولکول لپتین با یک تراپمر اولیه و دامنه‌ی شبه ایمونوگلوبولینی گیرنده‌ی لپتین با یک تراپمر ثانویه می‌شود (۱۵).

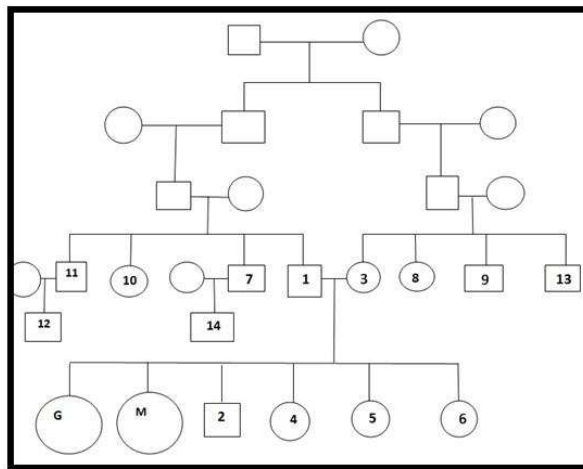


شکل ۲. نحوه‌ی اتصال ۲ مولکول لپتین با ۴ مولکول گیرنده‌ی لپتین از طریق جایگاه‌های I، II و III در مولکول لپتین (۱۳).

زنجیره‌ی طویل نوع b (ObRb) مسؤول اغلب اثرات شناخته شده‌ی لپتین از طریق دنباله درون سلولی کامل می‌باشد که پیام رسانی را از چهار مسیر مختلف شامل جینوس کیناز (Janus Kinase) و مبدل‌های علایم و فعال سازی رونویسی (JAK-STAT Signal transducer and activator of transcription)، پروتئین کیناز فعال شده‌ی با میتوزن (Mitogen-Activated Protein Kinase) یا MAPK، تری‌کیناز فسفاتیدیل اینوزیتول (Phosphatidyl inositol 3-kinase یا PI₃K) و کیناز فعال شده‌ی آدنوزین مونوفسفات

در مجموع، اقدام به تهیه‌ی ۱۶ نمونه‌ی DNA از گلبول‌های سفید خون این افراد نماید. در راستای رعایت اصول اخلاقی پژوهش، ضمن تشریح مطالعه، موافقت بچه‌ها، والدین و پزشک معالج خانواده‌ی مورد گزارش، مبنی بر انجام این پژوهش و انتشار نتایج آن در مجامع و منابع علمی-پژوهشی کسب گردید.

تولد وزن طبیعی داشته‌اند و از ۵ تا ۶ ماهگی چاقی غیرمعمول آن‌ها آغاز شده است. این خبر تیم ما را بر آن داشت تا جهت تهیه‌ی نمونه‌ی خون و شجره نامه از کلیه‌ی اعضای این خانواده‌ی ۸ نفره شامل پدر، مادر، یک فرزند پسر و پنج فرزند دختر و سایر فامیل‌های وابسته‌ی در دسترس مطابق درختچه‌ی شجرنامه‌ی آن‌ها (شکل ۴)، به منطقه اعزام شود و



شکل ۴. بالا: طرح درختچه‌ای شجره نامه‌ی خانوادگی (مربع: مرد، دایره: زن) مربوط به اعضای خانواده‌ی دو خواهر با چاقی مفرط که با دوایر بزرگ‌تر نمایش داده شده است.

پایین: تصویر دو خواهر با بیماری چاقی مفرط و وضعیت ژنتیکی مشابه موش‌های **db/db** (نقص در گیرنده‌ی لپتین) در بین سایر اعضای خانواده که دارای ظاهر سالم می‌باشند.

جدول ۱. پرایمرهای طراحی شده به صورت دو طرفه جهت پوشش دادن قسمت‌های مختلف بخش خارج سلولی گیرنده‌ی لپتین

| Forward primer | Reverse primer |
|------------------------------|---------------------------------|
| 5'-TACTTCCTTTTGCCTGCTGGAC-3' | 5'-AACACTGCAATTGCAGTGAACC-3' |
| 5'-TCTGGTGGAGTAATTTCCAGTC-3' | 5'-ACATTAGACCCAACACTTGTGTCAG-3' |
| 5'-TGCTGCAATGAACATGAATGCC-3' | 5'-CCATGACAACACTGTGTAGGCTG-3' |
| 5'-TAGATGGACTGGGATATTGGAG-3' | 5'-TTGCTCATAGGCCATGAAAAGG-3' |

استخراج DNA از خون افراد مورد آزمایش:

DNA گلبول‌های سفید موجود در خون کامل هپارینه‌ی افراد با استفاده از کیت DNG™-plus (شرکت سیناژن- ایران) بر اساس دستور العمل سازنده استخراج شد؛ بدین صورت که، پس از آن که دمای محلول DNG™-plus را همراه با تکان‌های آرام به 37°C رساندیم، به میزان $700\ \mu\text{l}$ از هر نمونه‌ی خون کامل هپارینه را با $400\ \mu\text{l}$ از محلول DNG™-plus مخلوط و $20-15$ ثانیه آن را ورتکس کردیم تا به طور کامل هموژن گردید. سپس، $500\ \mu\text{l}$ ایزوپروپانول به هر یک از نمونه‌ها اضافه و آن‌ها را با ورتکس مخلوط کردیم. نمونه را در دور $12000\ \text{rpm}$ به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ نموده، مایع رویی را به آرامی خالی کردیم و لوله‌ها را به صورت وارونه برای $3-2$ ثانیه بر روی کاغذ قرار دادیم. $1\ \text{ml}$ اتانول 75 درصد به رسوب اضافه کرده، آن را $5-3$ ثانیه ورتکس نمودیم و در دور $12000\ \text{rpm}$ به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ کردیم. اتانول را به طور کامل بیرون ریخته، رسوب را به مدت 5 دقیقه در 65°C خشک نمودیم و رسوب حاصل، که حاوی DNA بود را در $50\ \mu\text{l}$ آب مقطر استریل حل کرده، آن را به مدت 5 دقیقه در 65°C قرار دادیم. نمونه را به مدت 30 ثانیه در $12000\ \text{rpm}$ قرار دادیم. مایع رویی حاوی DNA خالص بود که می‌توان آن را در دمای 20°C تا مرحله‌ی ارسال جهت تعیین توالی نگهداری نمود.

طراحی پرایمرها و تعیین توالی نمونه‌ها:

طراحی پرایمرهای لازم جهت تعیین توالی نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار رایگان ارایه شده در این زمینه (۱۷) و با استفاده از توالی کامل آمینو اسیدی

گیرنده‌ی لپتین (۱۸) برای تبدیل آن به توالی کامل نوکلئوتیدی نرم‌افزار رایگان ارایه شده است (۱۹)، صورت گرفت. پرایمرها در 4 گروه به صورت دو طرفه جهت پوشش دادن قسمت‌های مختلف بخش خارج سلولی گیرنده‌ی لپتین به شرح جدول ۱ توسط شرکت سیناژن، ایران ساخته و تعیین توالی نیز توسط همان شرکت انجام شد.

مقایسه‌ی ساختار فضایی بر اساس مدل سازی:

برای ترسیم ساختار متعارف احتمالی قسمت‌هایی از بخش خارج سلولی گیرنده‌ی لپتین که دچار جهش‌های طبیعی شده بود و مقایسه‌ی آن با ساختار متعارف احتمالی سالم همان قسمت‌ها، از نرم‌افزار مدل سوئیزی استفاده شد (۲۳-۲۰). نتایج حاصل از پردازش توالی‌ها در نرم‌افزار اخیر در مدل اسکلت ساختمانی با استفاده از نرم‌افزار RasMol (۲۴) نمایش داده و مقایسه شد.

یافته‌ها

تعیین توالی برای ژن‌های دخیل در چاقی مفرط، مانند لپتین و گیرنده‌ی لپتین در نمونه‌ها انجام گردید و سپس نتایج آنالیز شد. نمونه‌ها جهت تعیین توالی گیرنده‌ی لپتین، که به طور طبیعی در طول‌ترین ایزوفورم آن شامل 1165 آمینو اسید می‌باشد، مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص شد که هر دو خواهر به صورت مشابه دچار دو جهش بد معنی شدن هموزیگوت در جایگاه 646 و 316 هستند. در صورتی که والدین آن‌ها برای هر دو جهش هتروزیگوت بودند که همان الل‌ها را به ارث بردند. جهش اول در اسید آمینه‌ی 316 رخ داده، با تغییر توالی نوکلئوتیدی cca به aca باعث تبدیل

سازی سوئیزی قسمتهایی از بخش خارج سلولی گیرنده‌ی لپتین، که دچار جهش‌های طبیعی شده بود، مورد مقایسه با ساختار متعارف احتمالی سالم همان قسمت‌ها قرار گرفت و اختلافات ساختمانی مربوط در مدل اسکلت ساختمانی در شکل ۵ نمایش داده شد

اسید آمینه‌ی پرولین به ترئونین شده بود؛ جهش دوم نیز در اسید آمینه‌ی ۶۴۶ رخ داده، با تغییر توالی نوکلئوتیدی tgg به tgc باعث تبدیل اسید آمینه‌ی تریپتوفان به سیستئین شده بود (جدول ۲). ساختار فضایی متعارف احتمالی بر اساس مدل

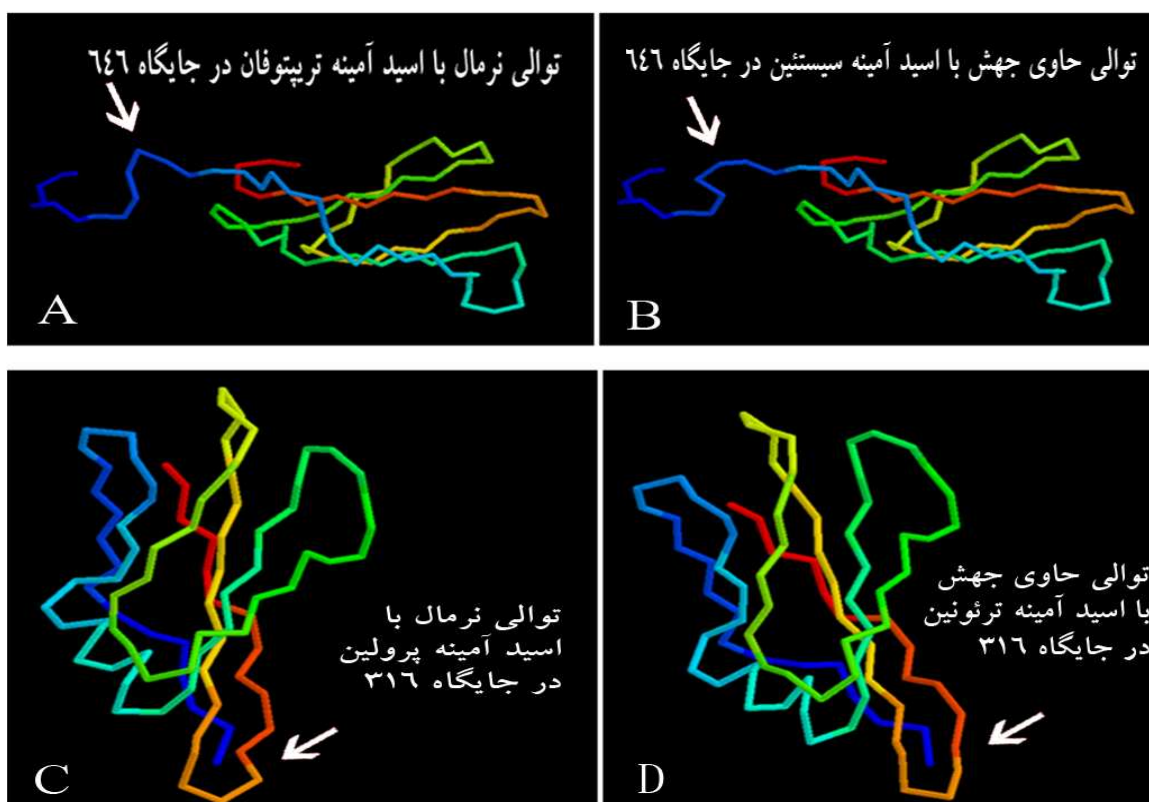
جدول ۲. جایگاه و نوع جهش ایجاد شده در توالی آمینواسیدی و نوکلئوتیدی بخش خارج سلولی گیرنده‌ی لپتین

.....KRLDGI(P)GIWSDWS.....RGPEFC(W)RIING..... توالی آمینواسیدی

.....ggatggcaca(cca)ggaat.....gaattt tgc (tgg) agaat..... توالی نوکلئوتیدی

جهش ۳۱۶: (Proline: CCT, CCC, CCA, CCG) to (Threonine: ACT, ACC, ACA, ACG)

جهش ۶۴۶: (Tryptophan: TGG) to (Cysteine: TGT, TGC)



شکل ۵. مقایسه‌ی ساختمان فضایی قسمتهایی از بخش خارج سلولی گیرنده‌ی لپتین در توالی طبیعی با معادل دقیق همین بخش در توالی حاوی جهش A. بخش خارج سلولی گیرنده‌ی لپتین در توالی طبیعی شامل اسیدهای آمینه‌ی شماره‌ی ۶۲۳-۷۲۳؛ B. معادل دقیق بخش مندرج در تصویر A، با این تفاوت که توالی حاوی جهش در جایگاه ۶۴۶، که در این جایگاه اسید آمینه تریپتوفان (یک اسید آمینه‌ی آروماتیک دارای حلقه‌ی بنزنی و غیر قطبی) در اثر یک جهش بد معنی شدن، جای خود را به اسید آمینه‌ی سیستئین (یک اسید آمینه‌ی مرکابتویی محتوی سولفور و قطبی) داده و باعث ایجاد اندکی تغییر در زوایای داخلی این مولکول گردیده است؛ C. بخش خارج سلولی گیرنده‌ی لپتین در توالی طبیعی شامل اسیدهای آمینه‌ی شماره‌ی ۳۲۸-۳۳۴؛ D. معادل دقیق بخش مندرج در تصویر C، با این تفاوت که توالی حاوی جهش در جایگاه ۳۱۶، که در این جایگاه اسید آمینه‌ی پرولین (یک اسید آمینه‌ی هتروسیکلیک و غیر قطبی) در اثر یک جهش بد معنی شدن جای خود را به اسید آمینه‌ی ترئونین (یک اسید آمینه‌ی هیدروکسیال و قطبی) داده و باعث ایجاد اندکی تغییر در زوایای داخلی این مولکول گردیده است.

بحث

نتایج یک سری از پژوهش‌ها نشان می‌دهد که گاهی چاقی مفرط در اثر جهش‌هایی است که روی ژن لپتین رخ می‌دهد. ژن لپتین در روی کروموزوم شماره‌ی ۷ انسانی قرار دارد؛ این تحقیقات در بین خانواده‌هایی از نژادهای مختلف صورت گرفته است (۲۷-۲۵).

بر اساس تحقیقاتی که روی مراحل مختلف اثرات اتصال مولکول لپتین به گیرنده‌ی آن صورت گرفته است، بعد از اتصال لپتین، تیروزین کیناز ۲ از خانواده‌ی جانوس مرتبط با $ObRb$ (JAK_2) از طریق فسفریله شدن خود به خود یا متقاطع، فعال شده، چهار تیروزین دامنه‌ی سیتوپلاسمی گیرنده را که شامل تیروزین‌های جایگاه‌های ۹۷۴، ۹۸۵، ۱۰۷۷ و ۱۱۳۸ در موش و ۹۷۴، ۹۸۶، ۱۰۷۸ و ۱۱۴۱ در انسان می‌باشد را فسفریله می‌نماید. عملکرد چهار تیروزین فسفریله شده به عنوان جایگاه بار انداز، واسطه‌های سیتوپلاسمی، همچون فاکتورهای انتقال دهنده‌ی علامتی و فعال کننده‌ی رونویسی $STAT$ (Signal transducer and activator of transcription)، به خصوص $STAT_3$ (در بعضی موارد همچنین $STAT_1$ و $STAT_5$) را فعال می‌کند (۲۹-۲۸).

تیروزین غشایی دورتر (جایگاه ۱۱۳۸ در موش و ۱۱۴۱ در انسان)، به عنوان یک جایگاه و بار انداز برای $STAT_3$ که سوبسترا برای JAK_2 است، عمل می‌کند. به دنبال دی‌مریزه شدن بعدی، $STAT_3$ به هسته منتقل شده، در این میان متوقف کننده‌های علامتی ۳ ساتیوکائینی ($SOCS_3$ Suppressor of cytokine signaling 3) و سایر ژن‌ها را القاء می‌کند. $SOCS_3$ بخشی از یک حلقه‌ی باز خوردی است که علامت دهی لپتین را از طریق اتصال تیروزین فسفریله شده

ممانعت می‌نماید. دامنه‌ی ۲ همولوژی SRC (SH_2) شامل فسفاتاز ۲ (SHP_2)، به تیروزین‌های با اندازه‌ی اول و دوم برگشت پیدا می‌کند و کیناز ۱/۲ تنظیم شده‌ی علامتی خارج سلولی (-Extracellular signal-regulated kinase 1/2 یا ERK 1/2) و مسیره‌های P_{38} پروتئین کیناز فعال کننده‌ی میتوزن (Mitogen-activated protein kinase یا $MAPK$) از طریق آداپتور نمودن گیرنده‌ی فاکتور رشد، پروتئین متصل به پروتئین ۲ را فعال می‌کند و سرانجام بیان FOS و JUN را القاء می‌نماید. بعد از اتصال لپتین، JAK_2 می‌تواند باعث القای فسفریله شدن پروتئین‌های سوبسترای ۱/۲ گیرنده‌ی انسولین ($Insulin$ receptor substrate 1/2) یا $PI3K$ 1/2 که مسؤل فعال سازی $PI3K$ (Phosphatidylinositol 3-kinase) است، گردد (۳۲-۲۸، ۶، ۴).

از طرفی Src مرتبط با پروتئین‌های میتوز ($Sam68$) که یک پروتئین متصل به RNA است و در تنظیم متابولیسم RNA از طریق عملکرد یک پروتئین آداپتور، که به طور معمول روی PI_3K مؤثر می‌باشد، می‌تواند $STAT_3$ و به دنبال آن، واحد P_{85} از PI_3K را با اتصال خود فعال کند. فسفوتیروزین فسفاتاز IB ($Phosphotyrosine$ phosphatase 1B یا PTP_{1B}) که روی سطح رتیکولاندوپلاسمیک متمرکز می‌باشد، در تنظیم منفی علامت دهی ObR_b از طریق دفسفوریله کردن JAK_2 بعد از درونی شدن کمپلکس ObR_b نقش دارد (۳۳).

در غیاب اتصال لپتین با گیرنده‌ی آن، دامنه‌های $FNIII$ و متعاقب آن دنباله‌های گیرنده‌ی سیتوپلاسمیک با $JAKs$ از هم جدا نگه داشته می‌شود تا باعث ممانعت فضایی فعالیت کیناز مستقل از اتصال ($Ligand$)

جهت ایجاد تمایل اتصال لپتین به گیرنده‌ی آن ظاهر نمی‌شود اما نقش اساسی در فعال سازی گیرنده به لیگاند اتصال دارد. جهش‌های Trp664Arg و His684Pro در تا خوردگی گیرنده ایجاد اختلال می‌کند و هر دو موتانت منجر به کامل شدن ناتوانی در علامت دهی به مسیرهای پایین دست می‌شود (۳۵).

در تحقیقی دیگر، جهش طبیعی بد معنی شدن در گیرنده‌ی لپتین در جایگاه ۶۱۲ شامل تغییر اسید آمینه‌ی آرژنین به هیستیدین در دامنه‌ی CHR2 گزارش شد (۱۴). آرژنین جایگاه ۶۱۲ محل اتصال لپتین با میل ترکیبی بالایی است (۳۶).

جهش Arg612His در بخش‌های درون سلولی گیرنده‌ی لپتین همچنان اندکی علامت دهی را حفظ می‌کند. اغلب جهش‌های مانند این جهش بیشتر روی تا خوردگی و نحوه‌ی بیان در سطح سلول مؤثرند تا روی اتصال لیگاند. در مورد Ala409Glu استثنایی وجود دارد که با جفت شدن لیگاند اتصال جهت فعال سازی گیرنده تداخل ایجاد می‌کند (۱۴). اغلب این جهش‌ها به صورت جداگانه رخ می‌دهند اما نشان داده شده است که در برخی موارد، هر چهار جهش به طور هم‌زمان در سطح سلول بیان می‌شود (۱۴).

در یک پژوهش جالب با استفاده از یک شیوه‌ی جدید سنجش تکمیلی JAK/STAT در ساختمان باز مورد نیاز برای تشکیل کمپلکس لپتین-گیرنده‌ی لپتین، مراحل نهایی تشکیل کمپلکس لپتین-گیرنده‌ی لپتین، نقش بهینه‌ی CRH1 به عنوان فعال کننده‌ی گیرنده‌ی لپتین، نقش اساسی دامنه‌ی شبه ایمنوگلوبولینی در اتصال لپتین و فعال سازی JAK و نقش ضروری عملکردی برای خود زنجیره‌ی گیرنده‌ی لپتین درون کمپلکس لپتین-گیرنده‌ی لپتین از جهت تطابق شباهت

(independent kinase activation) گردد. واسطه‌های اتصال پل‌های دامنه‌ی FNIII از دو دی‌مر متفاوت نزدیک به هم صورت می‌گیرد که به وسیله‌ی آن تشکیل پل‌های دی‌سولفیدی بعدی ممکن است کمپلکس را در مسیر صحیح خود، که منجر به پیام رونویسی می‌شود، تثبیت کند. آنچه که منجر به تقویت این نظریه می‌گردد، یک نوع حذف در دامنه‌ی خارج سلولی و باقی ماندن فقط دامنه‌های FNIII است که از نظر ساختمانی فعال باقی می‌ماند (۳۴).

اولین گزارش جهش طبیعی بد معنی شدن در گیرنده‌ی لپتین در سال ۲۰۰۸ ارائه شد و بین افرادی با چاقی مفرط مربوط به جایگاه‌های ۴۰۹، ۶۶۴ و ۶۸۴ بود که به ترتیب اسیدهای آمینه‌ی آلانین به گلوتامیک اسید، تریپتوفان به آرژنین و هیستیدین به پرولین تغییر یافته بود و این تغییرات به ترتیب در مورد جایگاه اول در دامنه‌ی شبه ایمنوگلوبولینی (تشکیل دهنده‌ی جایگاه اتصال III برای واکنش با لپتین می‌باشد) و در مورد جایگاه‌های دوم و سوم در قسمت فیروکتینی نزدیک به غشاء صورت گرفته است. همه‌ی موتانت‌های گیرنده‌ی لپتین A409E، W664R و H684P در پاسخ به لپتین یک نوع نقص در علامت دهی به STAT3 از خود نشان داده بود که با ناتوانی آن‌ها در فعال سازی مسیرهای درگیر در کاهش مصرف غذا سازگار بوده، منجر به چاقی مفرط می‌شد (۳۵).

در همان تحقیق، به وسیله‌ی جهش‌های منقطع کننده‌ی علامت دهی در دامنه‌ی خارج سلولی گیرنده‌ی لپتین، مکانیسم‌های مولکولی مورد آزمایش قرار گرفت و مشخص شد که در جهش Ala409Glu، لپتین به طور طبیعی به گیرنده متصل می‌گردد اما علامت دهی به مسیرهای پایین دست قطع می‌شود؛ این جایگاه اتصال

یا همومریک نشان داده شد (۳۷).

روبه‌رو هستند و بقیه دارای ظاهری کاملاً طبیعی می‌باشند. رابطه‌ای بین جنسیت و مشکل افزایش وزن در مورد این خانواده وجود نداشت؛ چرا که این دو خواهر، دارای خواهر و برادر سالم نیز می‌باشند. پدر و مادر این دو خواهر دارای رابطه‌ی فامیلی بودند؛ به طوری که پدران هر دوی آن‌ها با هم پسر عمو بودند.

احتمال می‌رود در پژوهش حاضر، جهش‌های بد معنی شدن هموزیگوت تبدیل تریپتوفان به سیستئین در جایگاه ۶۴۶ و پرولین به ترئونین در جایگاه ۳۱۶ که به ترتیب در دامنه‌ی CRH1 و قسمت فیرونکتینی FNIII می‌باشد نیز از طریق اختلال در سیگنال یا علامت دهی لپتین و ممانعت از فسفوریله شدن STAT3، باعث اشتباهی دایم همراه سیری ناپذیری و چاقی مفرط بیماران مورد بررسی شده باشد.

در طرح شجره نام‌ی این پژوهش نکات زیر قابل توجه می‌باشد؛ در بین کلیه‌ی افراد مندرج در طرح، فقط این دو خواهر از نظر ظاهری با چنین اختلالی

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر با حمایت مدیریت محترم تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان انجام گردیده است؛ نویسندگان از آن مدیریت و مسؤولان محترم دانشگاه اصفهان تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

- Rosenbaum M, Leibel RL. The role of leptin in human physiology. *N Engl J Med* 1999; 341(12): 913-5.
- Qiu J, Ogus S, Mounzih K, Ewart-Toland A, Chehab FF. Leptin-deficient mice backcrossed to the BALB/cJ genetic background have reduced adiposity, enhanced fertility, normal body temperature, and severe diabetes. *Endocrinology* 2001; 142(8): 3421-5.
- Cohen SL, Halaas JL, Friedman JM, Chait BT, Bennett L, Chang D, et al. Human leptin characterization. *Nature* 1996; 382(6592): 589.
- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 1995; 83(7): 1263-71.
- Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, et al. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 1996; 84(3): 491-5.
- Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem* 1997; 272(10): 6093-6.
- Matarese G, La Cava A, Sanna V, Lord GM, Lechler RI, Fontana S, et al. Balancing susceptibility to infection and autoimmunity: a role for leptin? *Trends Immunol* 2002; 23(4): 182-7.
- Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Trayhurn P. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett* 1996; 387(2-3): 113-6.
- Hegyí K, Fülöp K, Kovács K, Tóth S, Falus A. Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell Biol Int* 2004; 28(3): 159-69.
- Winick JD, Stoffel M, Friedman JM. Identification of microsatellite markers linked to the human leptin receptor gene on chromosome 1. *Genomics* 1996; 36(1): 221-2.
- Laschober GT, Brunauer R, Jamnig A, Fehrer C, Greiderer B, Lepperdinger G. Leptin receptor/CD295 is upregulated on primary human mesenchymal stem cells of advancing biological age and distinctly marks the subpopulation of dying cells. *Exp Gerontol* 2009; 44(1-2): 57-62.
- Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B, et al. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 1995; 377(6549): 527-9.
- Peelman F, Couturier C, Dam J, Zabeau L, Tavernier J, Jockers R. Techniques: new pharmacological perspectives for the leptin receptor. *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27(4): 218-25.
- Kimber W, Peelman F, Prieur X, Wangenstein T, O'Rahilly S, Tavernier J, et al. Functional characterization of naturally occurring pathogenic mutations in the human leptin receptor. *Endocrinology* 2008; 149(12): 6043-52.
- Peelman F, Iserentant H, De Smet AS, Vandekerckhove J, Zabeau L, Tavernier J. Mapping of binding site III in the leptin receptor and modeling of a hexameric leptin receptor complex. *J Biol Chem* 2006; 281(22): 15496-504.

16. La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(5): 371-9.
17. Chang Bioscience Inc. Primo Sequencing 3.4: Sequencing Primer Design. Available from: URL: <http://www.changbioscience.com/primo/primoseq.html>
18. Biology Department, Davidson College. Human Leptin and Leptin Receptor Protein Sequences. Available from: URL: <http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/chime/leptinseq.html>
19. Bioinformatics Organization. Reverse complement. Available from: URL: http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
20. Swiss Institute of Bioinformatics. SWISS-MODEL. Available from: URL: <http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>
21. Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(13): 3381-5.
22. Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 1997; 18(15): 2714-23.
23. Peitsch MC. Protein modeling by e-mail. *Nature Biotechnology* 1995; 13: 658-60.
24. University of Massachusetts Amherst. Free softwares. Available from: URL: <http://www.umass.edu/microbio.rasmol/>
25. Farooqi IS, O'Rahilly S. Leptin: a pivotal regulator of human energy homeostasis. *Am J Clin Nutr* 2009; 89(3): 980S-4S.
26. Gibson WT, Farooqi IS, Moreau M, DePaoli AM, Lawrence E, O'Rahilly S, et al. Congenital leptin deficiency due to homozygosity for the Delta133G mutation: report of another case and evaluation of response to four years of leptin therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(10): 4821-6.
27. Comuzzie AG, Allison DB. The search for human obesity genes. *Science* 1998; 280(5368): 1374-7.
28. Sweeney G. Leptin signalling. *Cell Signal* 2002; 14(8): 655-63.
29. Sanchez-Margalet V, Martin-Romero C. Human leptin signaling in human peripheral blood mononuclear cells: activation of the JAK-STAT pathway. *Cell Immunol* 2001; 211(1): 30-6.
30. Bjorbaek C, Buchholz RM, Davis SM, Bates SH, Pierroz DD, Gu H, et al. Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors. *J Biol Chem* 2001; 276(7): 4747-55.
31. Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MG, Jr. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem* 2000; 275(19): 14563-72.
32. van Den Brink EN, Turenhout EA, Davies J, Bovenschen N, Fijnvandraat K, Ouwehand WH, et al. Human antibodies with specificity for the C2 domain of factor VIII are derived from VH1 germline genes. *Blood* 2000; 95(2): 558-63.
33. De Rosa V, Procaccini C, Calì G, Pirozzi G, Fontana S, Zappacosta S, et al. A key role of leptin in the control of regulatory T cell proliferation. *Immunity* 2007; 26(2): 241-55.
34. Zabeau L, Defeau D, Iserentant H, Vandekerckhove J, Peelman F, Tavernier J. Leptin receptor activation depends on critical cysteine residues in its fibronectin type III subdomains. *J Biol Chem* 2005; 280(24): 22632-40.
35. Farooqi IS, Wangenstein T, Collins S, Kimber W, Matarese G, Keogh JM, et al. Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. *N Engl J Med* 2007; 356(3): 237-47.
36. Iserentant H, Peelman F, Defeau D, Vandekerckhove J, Zabeau L, Tavernier J. Mapping of the interface between leptin and the leptin receptor CRH2 domain. *J Cell Sci* 2005; 118(Pt 11): 2519-27.
37. Zabeau L, Defeau D, Van der HJ, Iserentant H, Vandekerckhove J, Tavernier J. Functional analysis of leptin receptor activation using a Janus kinase/signal transducer and activator of transcription complementation assay. *Mol Endocrinol* 2004; 18(1): 150-61.

Genetic Evaluation of a Hereditary Familial Severe Obesity Due to Naturally Occurring Mutation in the Leptin Receptor and Structure Homology Modelling of the mutated Molecule

Arash Babaee PhD¹, Seyed Hamid Zarkesh Isfahani PhD², Seyed Jamal Moshtaghian PhD²

Abstract

Introduction: Obesity, a growing universal problem, is a disorder/illness related to several factors. These factors include environmental, metabolic and genetic factors. Genetic studies have been undertaken for several different causative mutations involving obesity genes on different chromosomes and few mutations have been reported in that regard. Leptin is one of the most important adipose derived hormones with important role in regulating body weight through the inhibition of food intake and stimulation of energy expenditure. This hormone binds to leptin receptor that is present in surface of a number of cells especially to the ventromedial nucleus of the hypothalamus, known as the appetite centre, and it can activate intracellular signalling domains. A very small group of humans possess homozygous mutations for the leptin/leptin receptor genes which lead to a constant desire for food, resulting in severe obesity.

Methods: Here we introduce a hereditary familial mutation in leptin receptor gene of two young sisters from a Kurdish-Turkish family who were suffering from severe obesity. Blood samples were taken from all member of the family and DNA was extracted from leukocytes. Sequencing was performed for suspected genes involving in severe obesity. Canonical structures Swiss homology modelling of these molecules was prepared.

Finding: Data analysis showed that two sisters were homozygous for two different missense mutations in the leptin receptor. Their parents were heterozygous for these mutations.

Conclusion: The data suggests that these mutations have impaired the leptin signalling and therefore have caused severe obesity in these two sisters.

Keywords: Severe obesity, Homozygous Missense mutations, Leptin receptor, Swiss homology modelling.

¹ Assistant Professor, Department of Biology, School of Sciences, The University of Malayer, Malayer, Iran.

² Assistant Professor, Department of Biology, School of Sciences, The University of Isfahan, Isfahan, Iran.

Corresponding Author: Seyed Hamid Zarkesh Isfahani PhD, Email: s.h.zarkesh@sheffield.ac.uk