

网络出版时间: 2022-04-01 10:01 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220330.1420.022.html>

◇ 临床医学研究 ◇

纤毛通路基因罕见危害性基因变异对人腰骶部神经管畸形的致病性

汪静¹, 刘芳², 谢华², 蔡春泉³, 姜宏¹, 陈晓丽²

摘要 目的 探索纤毛通路基因的罕见危害性基因变异对人腰骶部神经管畸形(NTDs)的致病性。方法 AmpliSeq 技术扩增 49 个纤毛通路基因的编码区序列, PGM 测序平台筛查罕见危害性变异, 以无 NTD 表型父母为对照筛选 NTD 相关致病性变异。结果 1 例患者存在 *GLI3* 基因的罕见新生突变(c. C580T, p. H194Y); 1 例患者存在 *CRB2* 基因的罕见复杂杂合突变(c. G1392C, p. R464S; c. T3448C, p. C1150R)。结论 纤毛通路基因的罕见危害性变异可能与人类 NTDs 发生相关。

关键词 腰骶部神经管畸形; 纤毛通路基因; 罕见危害性变异

中图分类号 R 714.7; R 715.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)04-0626-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.04.022

神经管畸形(neural tube defect, NTDs)是一类由于胚胎发育早期神经管闭合失败或闭合不完全所致的严重出生缺陷。据统计, NTDs 的全球发病率为 0.5‰~2‰, 中国的发病率接近 2.74‰^[1]。NTDs 是一类由环境和遗传因素共同作用导致的复杂性疾病。目前通过人群及小鼠敲除模型研究已发现 400 多种可能导致神经管畸形的基因^[2], 其中热点基因包括 *CELSR1*、*FZD6*、*PRICKLE1*、*DVL2*、*VANGLI*、

VANGL2 等极性基因^[3]。近年研究^[4]认为新生突变是导致出生缺陷及神经发育疾病的常见原因。2015 年, Lemay et al^[5]对 43 个散发 NTDs 家系研究也证实新生突变是导致人腰骶部 NTDs 发生的原因之一。

纤毛是突出于细胞表面的微小细胞器并广泛存在, 与人类发育健康和疾病如麦克尔综合征(Meckel syndrome, MKS)、Joubert 综合征(Joubert syndrome, JS)等密切相关。上述综合征包括胎儿脊柱裂、脑脊膜膨出、脑组织缺如等与 NTDs 表型类似的临床表现。但关于纤毛基因变异与人 NTDs 的相关性研究较少, 本课题组前期研究^[6]证实: 同时参与纤毛发育的极性基因 *PARD3* 突变与人 NTDs 相关, 且均为颅部 NTDs。鲜有关于纤毛基因与人类腰骶部 NTDs 的相关性研究。该研究利用 AmpliSeq 技术设计了包括极性基因(如 *PARD3*)及明确纤毛病候选基因在内的 49 个纤毛相关基因的编码区靶向捕获 Pan-el 对 56 个散发腰骶部 NTDs 家系进行测序, 以期明确纤毛罕见危害性变异对人腰骶部 NTDs 发生的致病性。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选择在首都儿科研究所和天津市儿童医院明确诊断的腰骶部神经管畸形患者 56 例, 均无家族史, 其中男性 36 例, 女性 20 例。所有腰骶部神经管畸形患者由临床医师评估并影像学辅助诊断, 最终手术明确诊断。全部患者父母亦由临床医师评估结合影像学辅助诊断无神经管畸形。本研究通过首都儿科研究所伦理委员会审查, 所有患儿均由其父母或监护人签署知情同意书。

1.2 主要仪器及试剂 Qubit 2.0 荧光光度计、Ion OneTouch 油包水 PCR 仪、Ion OneTouch ES 仪、Ion Torrent PGM 测序仪(美国 Life Technologies 公司)。全血 DNA 提取试剂盒(美国 Qiagen 公司); Agencourt AMPure XP 磁珠化试剂(美国 Beckman Coulter 公司); Qubit dsDNA HS Assay 试剂盒、Ion PGM™

2022-01-21 接收

基金项目: 北京市自然科学基金(编号: 7202019); 国家自然科学基金(编号: 31671310); 首都卫生发展科研专项(编号: 首发 2020-2-1131); 安徽省科技攻关计划项目(编号: 1604a0802095)

作者单位: ¹ 中国人民解放军联勤保障部队第 901 医院生殖中心, 合肥 230031

² 首都儿科研究所北京市儿童发育和营养组学重点实验室, 北京 100020

³ 天津市儿童医院神经外科, 天津 300074

作者简介: 汪静, 女, 住院医师;

姜宏, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: jiangh105@sina.com;

陈晓丽, 女, 研究员, 博士生导师, 责任作者, E-mail: cxlwx@sina.com

200 Sequencing 测序试剂盒、Ion 316™ 芯片、Ion Xpress Barcode Adapters1-16 试剂盒、Ion AmpliSeq Library 试剂盒(美国 Life Technologies 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 DNA 制备 采集 56 例神经管畸形患儿及其表型正常父母外周血提取基因组 DNA, 采用 DNeasy Blood & Tissue kit 试剂盒(美国 Qiagen 公司)提取 DNA。取 2 μl 已提取的基因组 DNA, 应用紫外分光光度仪测量 DNA 浓度, A260/A280 = 1.8 ~ 2.0, A260/A230 > 2.0, 计算基因组 DNA 含量。

1.3.2 纤毛基因 Panel 的靶向深度测序 利用既往 NTD 小鼠模型中发现的纤毛基因^[2]、OMIM 系统内明确纤毛发育相关遗传病(<https://www.omim.org/>)及课题组最近发表的文章^[6]构建纤毛候选基因列表。采用 Ion AmpliSeq Library 在线设计系统形成纤毛基因的 AmpliSeq 靶向捕获和多重 PCR 扩增试剂盒, 之后和 Ion Xpress Barcode Adapters 试剂进行文库构建, 制备的文库片段大小为 200 ~ 300 bp; 接着用 Ion OneTouch™ 200 Template 试剂盒在 Ion OneTouch 上对文库进行乳化, 在 Ion OneTouch ES 上对磁珠进行富集; 最后采用 Ion PGM 200 试剂盒和 Ion 316™ 芯片在 Ion Torrent PGM 平台进行测序。

1.3.3 数据分析 实验数据自动传到 Ion Torrent 服务器, 点击已完成的测序, 根据要求完成 Coverage Analysis 和 Variant Caller 分析, 并对测序数据的数据量、平均测序深度、产生的 BAM、BAI、VCF、GZ、XLS 文件进一步分析。将 VCF、GZ 文件导入 wANNOVAR(<http://wannovar.usc.edu/>)软件, 分析所获各变异位点在人群的分布频率、氨基酸改变、变异分类(Indel、SNV), 优先选择 Loss of Function 变异, 根据错义变异的生物信息学软件(Mutation Taster, PROVEAN, Polyphen-2, REVEL)预测结果确定其危害性。将 BAM、BAI 文件导入软件 IGV, 明确各位点测序数据是否为真性突变, 排除测序得到的假阳性数据。

2 结果

2.1 测序数据基本情况 本研究收集的家系均为

1 个神经管畸形患儿配伍表型正常的父母, 因此首先筛选双位点罕见基因变异、新生基因变异。测序数据与公共数据库 [Genome1000、dbSNP、NHLBI、Exome Sequencing Project (ESP)、ExAC Browser] 对比, 结合神经管畸形的人群患病率, 锁定频率小于 1% 的外显子区非同义单核苷酸突变。对测序数据进行质量控制, 测序覆盖率 97% ~ 98%, 平均测序深度 400X ~ 600X。

2.2 NTDs 患者存在 CRB2 复杂杂合变异 测序结果显示, 1 例患儿存在 CRB2 基因两个突变位点的复杂杂合变异(c. G1392C, p. R464S; c. T3448C, p. C1150R), 且均为危害性突变。其中 c. G1392C, p. R464S 突变位点遗传自患儿母亲, 公共数据库中未见报道, 另一个突变位点 c. T3448C, p. C1150R 遗传自患儿父亲, 公共数据库中为罕见变异(MAF < 1%), 见图 1、表 1, 两突变位点在物种间高度保守, 见图 2。

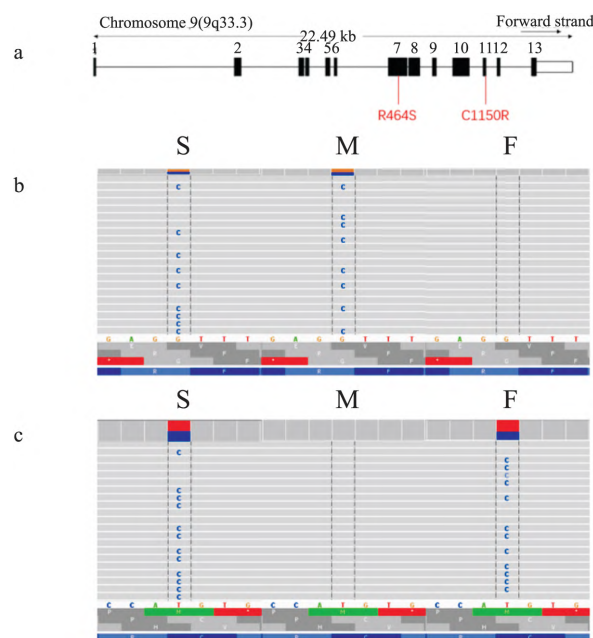


图 1 CRB2 复杂杂合突变位点信息

a: CRB2 基因结构, 红色标注分别为患者携带 CRB2; b: 患者 c. 1392G > C 变异来源于母亲; c: 患者 c. 3448T > C 变异来源于父亲; S、M、F 分别代表患者、母亲、父亲

表 1 突变位点基本信息

基因	突变位点	氨基酸改变	公共数据库	MutationTaster_pred	dbSNP
CRB2(NM_173689)	chr9: 126132724	exon7, heter. c. G1392C, p. R464S	未见报道	Deleterious	.
CRB2(NM_173689)	chr9: 126136916	exon11, heter. c. T3448C, p. C1150R	0.0001	Deleterious	rs202022214
GLI3(NM_000168)	chr7: 42088189	exon5, c. C580T, p. H194Y	未见报道	Deleterious	.

2.3 NTDs 患者存在 *GLI3* 新生突变 测序结果显示, 1 例患儿存在 *GLI3* 基因的一个新生突变 (c. C580T, p. H194Y), 该突变经软件预测为危害性突变, 且公共数据库均未见报道, 见表 1、图 3, 该突变位点在物种间高度保守, 见图 2。鉴于该家系发现的 *GLI3* 基因变异为新生错义突变, 笔者首先通过其他位点的连锁分析证实了患者与父母的亲子关系, 用 IGV 查看家系测序数据, 发现 *GLI3* 基因片段测序覆盖率及测序深度较低, 故采用 Primer 3.0 针对基因设计引物, 对所有家系进行 Sanger 测序验证, 证实了 *GLI3* 新生突变位点的真实性, 并且在其他

55 个家系均未见该基因的罕见变异, 见图 4。其余 54 个神经管畸形家系尚未发现双位点罕见基因变异及新生基因变异。

3 讨论

NTDs 作为多基因疾病, 存在高度遗传异质性。绝大多数 NTDs 病因不明。纤毛在生物的胚胎发生和维护器官完整性中发挥重要作用。纤毛的功能异常会造成一系列表型复杂且严重的人类疾病称为“纤毛病”。NTDs 是一系列纤毛病的重要表型之一, 如 MKS 患儿有脑膨出、多囊肾及并趾(指)等表型^[8]。同时 NTD 小鼠也存在纤毛异常表型^[3]。有研究^[9]报道纤毛相关基因 *DNAH1* 基因变异与人类 NTDs 发生相关。本课题组前期研究^[10]显示, 纤毛基因的拷贝数变异与人类 NTDs 相关。

本研究利用 AmpliSeq 技术设计了包括纤毛极性基因(如 *PAR3*)及明确纤毛病候选基因在内的 49 个相关基因的编码区靶向捕获 Panel, 对 56 个散发腰骶部 NTDs 家系进行测序, 发现两个可能与神经管畸形表型发生相关的基因: *CRB2* 及 *GLI3*。

CRB2 与 *CRB1* 及 *CRB3* 为同源基因, 均为 Crumbs 蛋白家族成员, 在视网膜、大脑和肾脏中均有表达。Crumbs 蛋白复合物(CRB-PALS1-PATJ 或 CRB-PALS1-MUPP1)与 PAR 蛋白复合物(PAR3-PAR6-aPKC)对发育的神经上皮细胞建立细胞极性

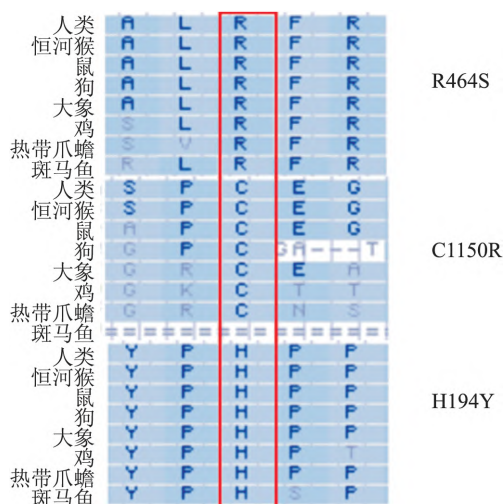


图2 突变位点在 8 个物种间保守性分析

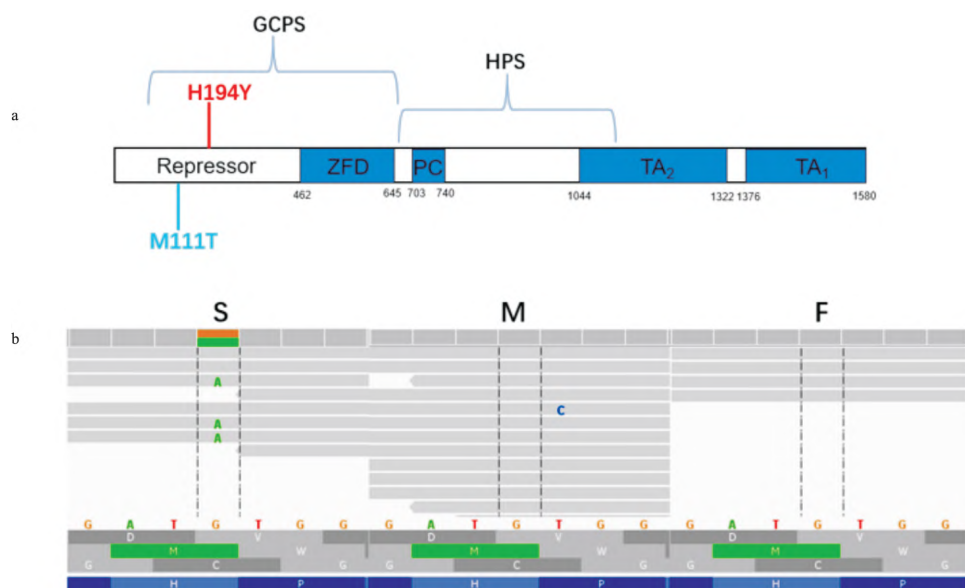
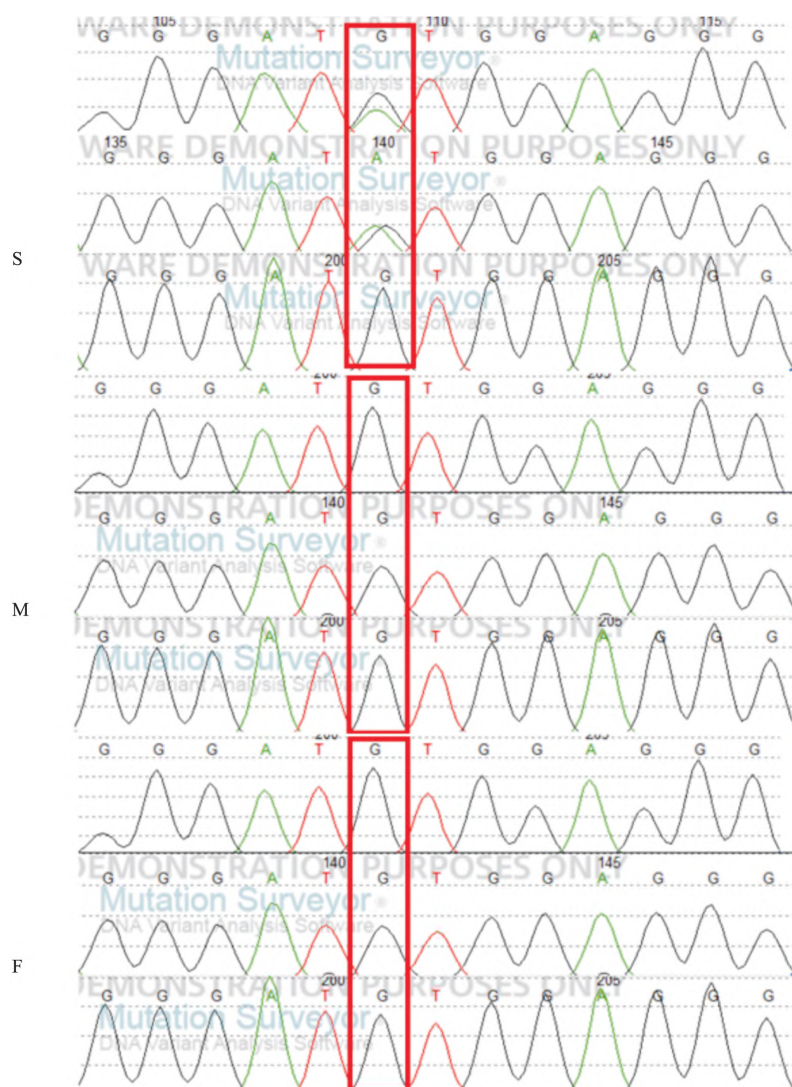


图3 *GLI3* 新生突变位点信息

a: *GLI3* 编码蛋白结构, 红色标注为本文患者携带 *GLI3* 新生突变, 蓝色标注为文献^[7]中食管闭锁伴有半椎体患者携带 *GLI3* 突变; b: panel 测序结果显示新生突变; S、M、F 分别代表患者、母亲、父亲

图4 Q100 家系成员 *GLI3* 基因变异 Sanger 测序验证结果

S: 患者; M: 母亲; F: 父亲

有重要作用^[11]。Boroviak et al^[12]对 *CRB2* 基因的功能研究表明 *CRB2* 对维持其他极性细胞的稳定性也是必要的,无 *CRB2* 基因表达的胚胎干细胞在神经细胞开始分化时无法存活。人类 *CRB2* 基因突变可导致局灶性肾小球硬化 (FGSG-9, MIM: 616220) 及一些纤毛相关疾病。本研究首次在 NTDs 家系发现 *CRB2* 基因突变,虽然其对神经管畸形的致病性尚不明确,但课题组前期通过病例对照研究^[6]发现与 *CRB2* 基因密切作用的复合物——*PARD3* 基因突变是人类 NTDs 的危险因素;通过突变子的体外细胞功能实验和基因敲除的鸡胚形态学实验证实,*PARD3* 基因 aPKC 结构域突变后可导致神经上皮细胞极性消失,该基因敲除后神经管腔化异常。小鼠模型研究^[13]发现,*CRB2* 基因敲除后,*PALS1* 和 *PARD3* 基因表达明显下调,而 *PALS1* 基因敲除后

MDCK 细胞的管腔化异常。本研究中 1 例单纯腰骶部神经管畸形家系患者携带 *CRB2* 的复杂杂合变异,软件预测均为危害性变异,考虑可能为该家系中患者的发病原因。尚需通过更多的病例-对照研究进一步证实 *CRB2* 基因罕见变异和人 NTDs 发生的关系。

GLI3 是 GLI 家族锌指结构 3。GLI 家族锌指蛋白是经典 hedgehog (HH) 信号通路的转录效应因子,参与胚胎形态发生的各个阶段,并且是组织正常发育的必须调节因子。*GLI3* 基因突变与格雷格头、多指(趾)、并指(趾)综合征 (Greig cephalon polysyndactyly syndrome, GCPS) 等相关。*GLI3* 突变小鼠因大脑、脊柱、四肢、肺等多器官缺陷无法存活。2014 年 Yang et al^[7]报道 1 例食管闭锁伴半椎体患者携带一个 *GLI3* 的新生突变 (M111T),进一步行蛋白功

能实验发现:该突变可导致内源性 *SKIL* 表达下降,并且 *GLI3* 与 *SKI* 家族蛋白-*SKIL* 间的相互关系减弱提示该突变可通过影响 *GLI3* 与 *SKIL* 的相互作用导致患者出现食管闭锁及半椎体表型。2019 年, Renard et al^[14] 首次发现一个 *GLI3* 基因 SNP (c.4609C>T, rs35364414) 在人类腰骶部 NTDs 中富集。研究显示,人类腰骶部 NTDs 患者中存在 *GLI3* 的新生突变(H194Y),该突变同处于 *GLI3* 基因的 Repressor 域,该区域主要参与同 *SKI* 家族蛋白的相互作用,且 *GLI3* 基因 M111T 突变患者表型中存在半椎体,因此考虑 *GLI3* 基因的新生突变(H194Y)可能为该家系中患者的发病原因。后续仍需对 H194Y 突变进行功能试验进一步验证。

参考文献

- [1] 李宏智. 神经管畸形病因遗传学研究进展[J]. 临床军医杂志 2018 46(6): 727-9.
- [2] Harris M J, Juriloff D M. An update to the list of mouse mutants with neural tube closure defects and advances toward a complete genetic perspective of neural tube closure[J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 2010 88(8): 653-69.
- [3] Juriloff D M, Harris M J. Share insights into the etiology of mammalian neural tube closure defects from developmental, genetic and evolutionary studies[J]. J Dev Biol 2018 6(3): 22.
- [4] Veltman J A, Brunner H G. De novo mutations in human genetic disease[J]. Nat Rev Genet 2012 13(8): 565-75.
- [5] Lemay P, Guyot M C, Tremblay É, et al. Loss-of-function de novo mutations play an important role in severe human neural tube defects[J]. J Med Genet 2015 52(7): 493-7.
- [6] Chen X L, An Y, Gao Y H, et al. Rare deleterious PARD3 variants in the aPKC-binding region are implicated in the pathogenesis of human cranial neural tube defects via disrupting apical tight junction formation[J]. Hum Mutat 2017 38(4): 378-89.
- [7] Yang L, Shen C, Mei M, et al. De novo *GLI3* mutation in esophageal atresia: Reproducing the 2 phenotypic spectrum of *Gli3* defects in murine models[J]. Biochim Biophys Acta 2014 1842(9): 1755-61.
- [8] Satir P, Christensen S T. Overview of structure and function of mammalian cilia[J]. Annu Rev Physiol 2007 69: 377-400.
- [9] Miao C Y, Jiang Q, Li H L. Mutations in the motile cilia gene DNAH1 are associated with neural tube defects in humans[J]. G3 (Bethesda) 2016 6(10): 3307-16.
- [10] Chen X, Shen Y, Gao Y, et al. Detection of copy number variants reveals association of cilia genes with neural tube defects[J]. PLoS One 2013 8(1): e54492.
- [11] Chen X, Jiang C, Yang D D, et al. CRB2 mutation causes autosomal recessive retinitis pigmentosa[J]. Exp Eye Res 2019 180: 164-73.
- [12] Boroviak T, Rashbass P. The apical polarity determinant Crumbs 2 is a novel regulator of ESC-derived neural progenitors[J]. Stem Cells 2011 29(2): 193-205.
- [13] Tan B, Yatim S M J M, Peng S, et al. The mammalian crumbs complex defines a distinct polarity domain apical of epithelial tight junctions[J]. Curr Biol 2020 30(14): 2791-804. e6.
- [14] Renard E, Chéry C, Oussalah A, et al. Exome sequencing of cases with neural tube defects identifies candidate genes involved in one-carbon/vitamin B12 metabolisms and Sonic Hedgehog pathway[J]. Hum Genet 2019 138(7): 703-13.

The pathogenicity of rare damaging variants from ciliary pathway to human lumbosacral neural tube defects

Wang Jing¹, Liu Fang², Xie Hua², Cai Chunquan³, Jiang Hong¹, Chen Xiaoli²

(¹Reproductive Medicine Center, The 901 Hospital of the Joint Logistic Support Force of the People's Liberation Army, Hefei 230031; ²Beijing Municipal Key Laboratory of Child

Development and Nutriomics, Capital Institute of Pediatrics Beijing 100020;

³Dept of Neurosurgery, The Children's Hospital of Tianjin, Tianjin 300074)

Abstract Objective To investigate the pathogenicity of rare damaging variants from ciliary pathway to human lumbosacral neural tube defects (NTDs). **Methods** The coding region sequences of 49 ciliary genes were amplified by AmpliSeq technique and sequenced by PGM sequencing platform for screening the rare damaging variants, and the parents without phenotype were used as controls to evaluate the pathogenicity of variants. **Results** The rare de novo mutation of *GLI3* gene (c. C580T p. H194Y) was detected in one patient. The rare complex heterozygous mutations of *CRB2* gene (c. G1392C p. R464S; c. T3448C p. C1150R) was detected in another patient. **Conclusion** Rare damaging variants from ciliary pathway may be associated with the occurrence of human lumbosacral NTDs.

Key words lumbosacral neural tube defects; ciliary genes; rare damaging mutation