

· 临床研究 ·

基于外显子组测序的 Axenfeld-Rieger 综合征致病突变筛查

王琦 刘鑫娜 邵正波 原慧萍

哈尔滨医科大学附属第二医院眼科 哈尔滨医科大学心肌缺血教育部重点实验室 哈尔滨医科大学附属第二医院未来医学实验室, 哈尔滨 150086

通信作者: 原慧萍, Email: yuanhp2013@126.com

【摘要】 目的 对 Axenfeld-Rieger 综合征 (ARS) 一家系进行临床检查和基因检测, 寻找致病突变。**方法** 采用家系调查研究方法, 纳入 2018 年于哈尔滨医科大学附属第二医院就诊的中国汉族 ARS 一家系, 该家系 3 代共 15 人, 其中患者 3 例。详细记录家族史, 进行眼科及全身一般检查。采集受检者外周静脉血 2~5 ml 并提取淋巴细胞基因组 DNA 和 RNA。对先证者 DNA 进行外显子组测序, 利用人群数据库及生物信息学分析筛选可疑突变, Sanger 测序和实时荧光定量 PCR 进行验证, 对可疑突变进行保守性和有害性预测, 参照美国医学遗传学与基因组学学会 (ACMG) 遗传变异分类标准与指南对候选罕见变异进行致病性评估。**结果** 3 例患者均存在 ARS 典型的眼部、牙齿和肚脐发育异常, 且均携带 *PITX2* 基因 c. 525delC (p. Asp175Glufs*) 杂合突变, 家系中其他人员无相应临床表型且未检测到该变异位点, 符合家系共分离。3 例患者 *PITX2* mRNA 相对表达量为 0.672 ± 0.063 , 明显低于健康对照的 1.015 ± 0.179 , 差异有统计学意义 ($t = 8.847, P < 0.001$)。dbSNP、1000G、gnomeAD、ExAC、Korea1K、EVS 数据库中均未收录该变异, MutationTaster 评为有害, 受影响的氨基酸序列在 9 种动物中保守存在。ACMG 遗传变异分类标准和指南评价该变异位点为致病变异。**结论** *PITX2* 基因 c. 525delC (p. Asp175Glufs*) 变异为该家系患者的致病变异, 首次在中国 ARS 家系中报道。**【关键词】** Axenfeld-Rieger 综合征; 家系; 基因检测; 全外显子组测序; *PITX2* 基因; 移码突变**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (82070956); 黑龙江省应用技术与开发计划项目 (GA20C008); 哈尔滨医科大学研究生科研和实践创新项目 (YJSSJXCX2019-45HYD)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200802-00555

Screening of pathogenic mutation in a family with Axenfeld-Rieger syndrome by whole exome sequencing

Wang Qi, Liu Xinna, Shao Zhengbo, Yuan Huiping

Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, The Key Laboratory of Myocardial Ischemia, Harbin Medical University, Ministry Education, Future Medical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China

Corresponding author: Yuan Huiping, Email: yuanhp2013@126.com

【Abstract】 Objective To identify disease-causing variation in a Chinese family with Axenfeld-Rieger syndrome (ARS) through the analysis of clinical symptoms and hereditary information. **Methods** The method of pedigree investigation was adopted. A Chinese ARS family including 15 family members of 3 generations was recruited in the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University in 2018. There were 3 patients in the family. The family history and clinical data were collected. Ophthalmic and general examinations were carried out in all the members included. DNA and RNA were extracted from collected peripheral venous blood samples of 2–5 ml from each member. Whole exome sequencing was used to screen the variations in the proband. Suspected variations screened through searching population databases and bioinformatics analysis were verified by Sanger sequencing and real-time quantitative PCR. Conservation analysis and deleteriousness prediction of suspected variations were conducted. The pathogenicity of candidate rare variations were evaluated according to the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) standards and guidelines. This study followed the Declaration of Helsinki. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University (No. KY2019-231).Written informed consent was obtained from each subject or custodian prior to entering the study cohort. **Results**

The 3 patients all had typical ARS clinical features in eyes, teeth and umbilicus, and carried the same heterozygous variant, c. 525delC (p. Asp175Glufs*) in the *PITX2* gene, which were not found in other members, indicating co-segregation. The relative expression of *PITX2* mRNA was 0.672 ± 0.063 in the patients, which was significantly lower than 1.015 ± 0.179 in the healthy controls ($t = 8.847, P < 0.001$). This variant was not recorded in dbSNP, 1000G, genomeAD, ExAC, Korea1K and EVS databases, and it was labelled as deleterious by MutationTaster. The affected conservative amino acid sequences were found in 9 species. The variant was determined as pathogenic according to the ACMG standards and guidelines. **Conclusions** The c. 525delC (p. Asp175Glufs*) mutation of *PITX2* gene is pathogenic in the pedigree. This is the first time that this mutation has been reported in Chinese family with ARS.

[Key words] Axenfeld-Rieger syndrome; Pedigree; Genetic testing; Whole exome sequencing; *PITX2* gene; Frameshift mutation

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82070956); Applied Technology Research and Development Program of Heilongjiang Provincial Science and Technology Department (GA20C008); Postgraduate Research & Practice Innovation Program of Harbin Medical University (YJSSJCX2019-45HYD)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200802-00555

Axenfeld-Rieger 综合征 (Axenfeld-Rieger syndrome, ARS) 是一组涉及虹膜和房角的罕见发育性遗传病, 其在新生儿中的发病率为 $1/100\ 000 \sim 1/50\ 000$ ^[1], 多为常染色体显性遗传, 偶有散发病例报道, 无明显种族和性别差异。眼部以角膜后胚胎环、虹膜前粘连和虹膜发育不良为特征, 约 50% 的患者伴有青光眼。ARS 患者也可伴有颌骨发育不良及牙齿、脐部、心脏发育异常等。但因发育异常涉及的部位和严重程度不同, 患者临床表现差异很大, 虹膜异常可以表现为轻度基质变薄、纹理异常、瞳孔移位, 也可因基质缺损导致虹膜裂孔 (即多瞳孔) 和瞳孔变形, 而眼部轻微异常且不伴有全身发育缺陷者极易被误诊或漏诊, 因此明确的基因诊断不仅有助于指导优生优育、理解发病机制, 也可为临床诊断提供参考, 更有助于提示医生关注全身其他系统发育异常, 早期干预, 改善患者预后。编码转录因子的 *PITX2* 和 *FOXC1* 基因是目前已知的 ARS 致病基因, 但由于 ARS 具有遗传异质性, 仅有 40% 的患者可检出上述基因变异^[1], 因此针对已知致病基因进行 Sanger 测序的传统 ARS 致病突变筛查方法无法为所有患者提供遗传诊断。全外显子测序 (whole exome sequencing, WES) 可以快速、高效地检测基因组中对蛋白质结构有影响的外显子区变异, 结合生物信息学手段能够迅速锁定罕见的可疑致病变异。本研究采用 WES 结合 Sanger 测序验证对 ARS 患者进行基因突变检测和突变致病性分析, 旨在明确 ARS 诊断, 为患者及其家系成员提供精准的临床诊疗和遗传咨询, 为 ARS 的机制研究提供遗传学基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料

采用家系调查研究方法, 纳入 2018 年就诊于哈尔

滨医科大学附属第二医院眼科的中国汉族眼前节发育异常一家系, 详细询问患者病史及家族史。先证者就诊时 10 岁, 该家系 3 代共 15 人, 其中患者 3 例。本研究遵循《赫尔辛基宣言》, 研究方案经哈尔滨医科大学附属第二医院医学伦理委员会批准 (批文号: KY2019-231), 参与本研究的家系成员或其监护人均对本研究目的知情并自愿签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 眼科及全身一般检查 参与研究的家系成员均接受专业眼科检查, 采用标准对数远视力表检查最佳矫正视力; 采用裂隙灯显微镜 (SL-1E, 日本拓普康公司) 检查眼前节; 采用非接触式眼压计 (CT-80, 日本拓普康公司) 测量健康人眼压, 采用回弹式眼压计 (TA01i, 芬兰 iCare 公司) 测定患者眼压; 采用裂隙灯图像系统 (YZ5T, 苏州六六视觉科技股份有限公司) 行眼前节照相以记录眼前节及房角情况; 采用儿童数字化广域成像系统 (RetCam, 美国科瑞公司) 观察并记录患儿房角异常情况; 采用数字眼底照相机 (CR-2, 日本佳能公司) 行彩色眼底照相记录视网膜、脉络膜情况。同时进行全身一般检查, 必要时进行专科检查。

1.2.2 基因组 DNA 提取 采集配合基因分析的家系成员外周静脉血 2~5 ml, 置于 EDTA 抗凝管中于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 条件下保存备用。按照外周血基因组 DNA 提取试剂盒 (DP304, 北京天根生化科技有限公司) 说明书提取基因组 DNA。

1.2.3 外显子组测序 使用 Qubit 测量先证者 DNA 样本浓度, 琼脂糖凝胶电泳检查样本质量, 合格后进行 WES。使用 Agilent SureSelect 人全外显子 V6 试剂盒 (美国 Agilent 公司) 进行外显子捕获, 文库构建完成后在 NovaSeq 6000 平台 (美国 Illumina 公司) 进行测序。

1.2.4 原始数据处理及注释 过滤掉测序所得数据



中带有接头和低质量的数据,得到的有效数据通过 BWA 软件比对到参考基因组 (GRCh37/hg19), 比对结果经 SAMtools 排序、Picard 标记重复序列后, GATK 软件检测单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 和插入/缺失 (insertion/deletion, InDel) 变异, 采用 SnpEff 软件对突变位点进行结构注释并过滤掉 dbSNP 中已经收录的等位基因频率 > 0.05 的变异, 结果文件经 wANNOVAR 工具^[2]再次注释。

1.2.5 结合人群数据库和生物信息学评估筛选可疑致病突变 将注释后得到的 SNP 和 InDel 变异按如下步骤进行筛选: (1) 保留剪接变异和外显子区变异, 排除非编码变异和同义变异; (2) 保留千人基因组计划 (1000 Genomes Project, 1000G)、Exome Aggregation Consortium (ExAC)、Genome Aggregation Database (gnomAD) 基因组和外显子组测序数据库中全球或亚洲人等位基因频率 < 0.000 1 或未收录的变异; (3) 比对课题组内部与该家系无血缘关系者 WES 变异数据, 排除 2 人以上同时具有的常见变异; (4) 保留 SIFT、PolyPhen-2、MutationTaster、CADD (Phred > 20) 预测为有害的基因突变; (5) 比对查找已报道 ARS 相关基因; (6) 其他相关突变的排查, 包括通过相互作用基因库检索工具 (Search Tool Retrieval of Interacting Genes, STRING) 数据库^[3-4]对可疑突变基因进行蛋白相互作用网络分析, 寻找 PITX2、FOXC1 相关蛋白; 通过注释、可视化和集成发现数据库 (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, DAVID) 在线工具^[5]对可疑基因进行基因本体 (gene ontology, GO) 分析, 寻找与 PITX2 和 FOXC1 在相同生物过程 (biological processes, BP) 注释条目下的基因。

1.2.6 Sanger 测序共分离验证及致病性评估 针对可疑致病突变设计特异扩增引物, 采用 PCR 试剂金牌 Mix (TSE101, 北京擎科生物科技有限公司) 在 S1000™ Thermo Cycler PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司) 上扩增目的片段后, Sanger 测序验证排除假阳性, 并在家系成员中验证该突变在正常家系成员和患者中出现基因型与临床表型共分离。引物合成和 Sanger 测序均由擎科生物哈尔滨分公司完成, 测序结果用 Chromas 软件对基因序列进行对比分析。利用 UGENE 软件^[2,6-7]对人、黑猩猩、猕猴、犬、牛、小鼠、大鼠、鸡、斑马鱼 9 种动物进行氨基酸的保守性分析。补充查找韩国基因组计划 (Korean Genome Project, Korea1K)、Exome Variant Server (EVS) 数据库, 查看该突变在人群中的等位基因频率。参照美国医学遗传学与基因组学学会 (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) 遗传

变异分类标准与指南对候选罕见变异进行评估^[8]。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 法检测健康人及受检者淋巴细胞 PITX2 mRNA 表达 按照超纯 RNA 提取试剂盒 (CW0581S, 北京康为世纪生物科技有限公司) 说明书提取家系中 3 例患者和 2 名健康人以及 1 名与家系无关的健康人外周血淋巴细胞 mRNA, 采用逆转录试剂盒 (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, 瑞士 Roche 公司) 逆转录成 cDNA, 利用 NCSYB GREEN qPCR Master Mix (NC-BM601, 哈尔滨纳川生物技术有限公司) 在 C1000™ Thermo Cycler 荧光 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司) 上进行实时荧光定量 PCR 检测。PITX2 正向引物序列为 5'-GACATGTACCCAGGCTATTCC-3', 反向引物序列为 5'-GGGTTGACGTTTCATAGAGTTGA-3'。以 GAPDH 作为内参, 正向引物序列为 5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3', 反向引物序列为 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'。反应条件: 95 °C 预变性 15 min; 95 °C 变性 10 s, 56 °C 退火及延伸 30 s, 39 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 PITX2 mRNA 相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0.2 统计学软件进行统计分析。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 患者与健康对照目的基因 mRNA 相对表达量的比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 家系成员临床特征

该家系中发病者在 2 代中连续出现, 先证者双亲中有一方患病, 符合已知 ARS 常染色体显性遗传特点, 但不排除伴 X 染色体显性遗传可能 (图 1)。患者 II-3、III-3 和 III-4 眼部表现为不同程度角膜混浊、角膜后胚胎环、虹膜发育不良、瞳孔移位、虹膜前粘连, 伴双眼眼压升高 (图 2A~C)。其中先证者 III-3 左眼角膜

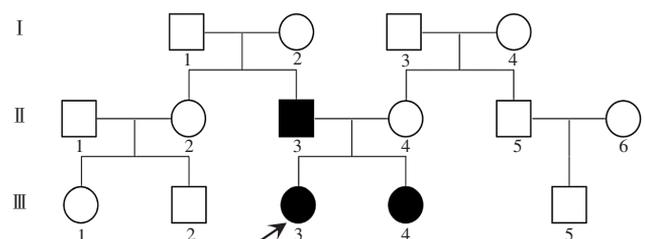


图 1 ARS 家系图 □: 正常男性; ○: 正常女性; ■: 男性患者; ●: 女性患者; ↗: 先证者

Figure 1 Pedigree of the ARS family □: normal male; ○: normal female; ■: affected male; ●: affected female; ↗: proband

呈现灰白色混浊、虹膜隐约可见,激光扫描共焦显微镜检查发现左眼角膜上皮可见大泡、上皮下散在瘢痕结构、神经纤维缺失。3 例患者均存在面中部扁平、牙齿缺损和尖牙、脐部皮肤突出(图 2D~G)。I-2、II-4 均未发现眼部及全身异常。

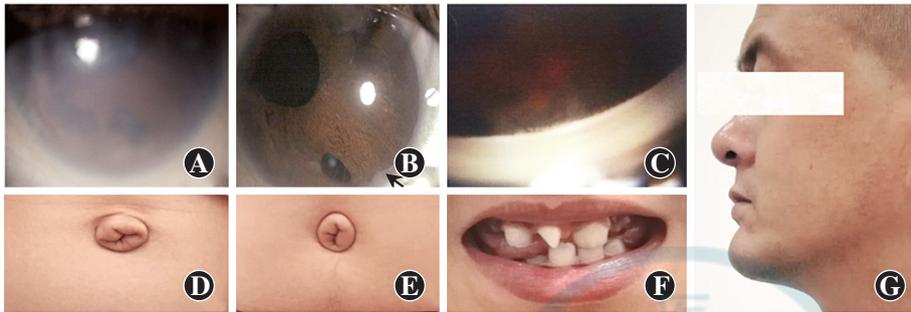


图 2 Axenfeld-Rieger 综合征患者临床特征 A,B:裂隙灯显微镜下可见患者 III-4 双眼角膜混浊、后胚胎环(箭头)、瞳孔变形、移位、多瞳孔、虹膜发育不良(A:右眼;B:左眼) C:患者 III-4 周边虹膜前粘连 D,E:患者 III-4 和 II-3 脐部皮肤突出 F:患者 III-3 牙齿缺失、小牙 G:患者 II-3 上颌骨发育不全伴面中部扁平

Figure 2 Clinical features of patients with Axenfeld-Rieger syndrome A,B:Corneal opacification, posterior embryotoxon (black arrow), dyscoria, corectopia, polycoria and iris stroma hypoplasia in the right eye (A) and left eye (B) of patient III-4 observed under a slit lamp microscope C:Peripheral anterior synechiae of patient III-4 D,E:Protruding umbilicus of patients III-4 (D) and II-3 (E) F:Hypodontia and microdontia of patient III-3 G:Maxillary hypoplasia with midface flattening of patient II-3

2.2 WES 测序分析

先证者 III-3 WES 目标区域覆盖度为 97.74%,深度不低于 30×的碱基比例为 93.24%,各染色体平均覆盖深度均超过 100×。排除测序结果中公共数据库和内部数据库非罕见变异,保留对蛋白质序列影响较大的突变 121 个。生物信息学软件预测发现,2 个 InDel 变异、1 个剪接突变、3 个无义突变被 MutationTaster 评价为已知有害或可能有害,35 个错义突变被 CADD 和 SIFT 评价为有害且 MutationTaster 和 Polyphen-2 至少 1 个软件评为有害,其中包括 ARS 致病基因 *PITX2* 的 InDel 变异。上述 41 个突变涉及的基因作为候选基因与已知 ARS 致病基因进行进一步生物信息学分析,STRING 分析选取蛋白交互作用评分大于 0.4(中等可信度)的基因,发现 *SIX2* 与 *PITX2* 相互作用(图 3A),DAVID 注释发现 8 个基因与 *PITX2* 或 *FOXC1* 具有相似功能,位于细胞

迁移、DNA 为模板的转录调控和起源于 RNA 聚合酶 III 启动子的转录等 GO-BP 注释条目下(图 3B)。

2.3 可疑致病突变验证及分析

上述候选基因变异中涉及 ARS 致病基因 *PITX2* (NM_000325.6) 杂合突变 c.525delC,家系验证发现

II-3、III-3、III-4,即家系中临床诊断为 ARS 者均携带该突变,而表型正常的 I-2、II-4 不携带该变异,符合家系共分离(图 4A)。3 例患者外周血淋巴细胞中 *PITX2* mRNA 相对表达量为 0.672 ± 0.063 ,明显低于健康对照的 1.015 ± 0.179 ,差异有统计学意义 ($t = 8.847, P < 0.001$) (图 4B)。dbSNP、1000G、gnomeAD、ExAC、Korea1K、EVS 数据库中均未收录该变异, MutationTaster 评为有害。预测蛋白质水平发生移码突变 p. Asp175Glufs* (NP_000316.2),序列长度由 324 个氨基酸截短至 206 个, *PITX2* 蛋白保守结构域之一 OAR 结构域缺失,受影响的氨基酸序列在 9 种动物中保守存在(图 4C)。根据 ACMG 遗传变异分类标准和指南判定,该家系 *PITX2* 基因突变 c.525delC/p. Asp175Glufs* 满足 1 个 PS 证据、3 个 PM 证据、2 个 PP 证据,证实该突变为致病变异。

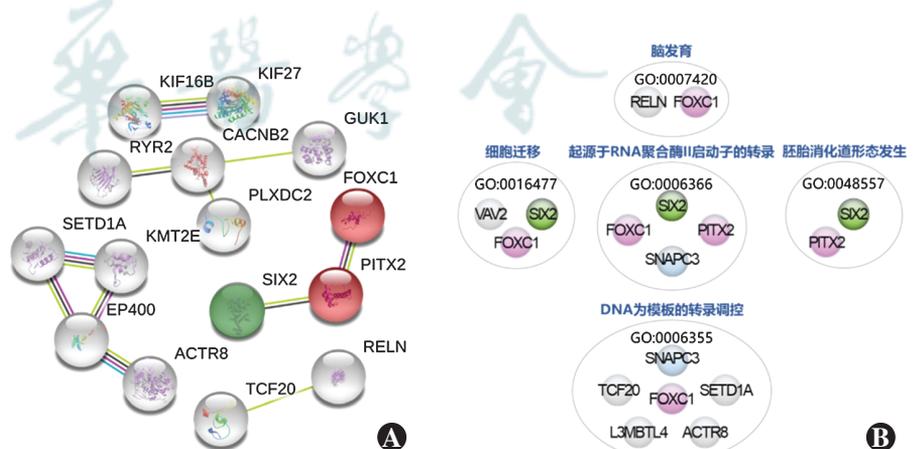


图 3 候选基因的生物信息学分析 A:已知致病基因 *FOXC1* 和候选基因的蛋白相互作用网络图(仅标注与其他蛋白有相互作用的候选基因蛋白名) B:与 *PITX2* 或 *FOXC1* 基因具有相同生物学过程的候选基因集合

Figure 3 Bioinformatics analysis of candidate genes A:Protein-protein interaction network of *FOXC1* and candidate genes (names of proteins displayed having interactions with others) B:Candidate gene set with the same biological processes of *PITX2* and *FOXC1*

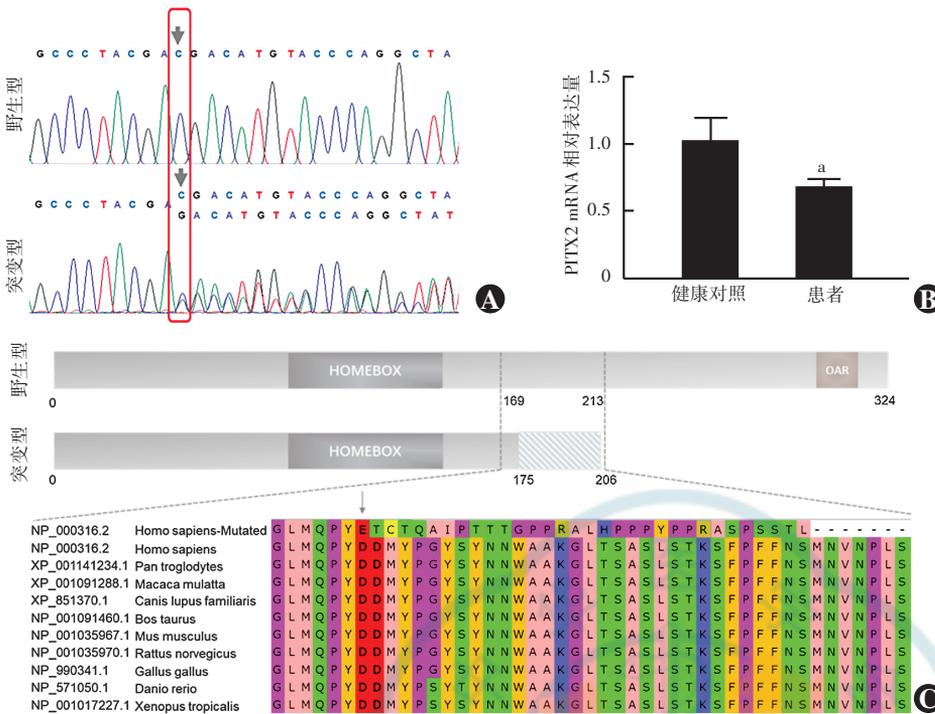


图 4 *PITX2* 基因突变 Sanger 测序结果及突变功能分析 A: 患者及健康对照 Sanger 测序峰图 B: 患者与健康对照 *PITX2* mRNA 相对表达量比较 与健康对照比较, $^aP < 0.001$ (独立样本 *t* 检验, $n = 3$) C: *PITX2* 基因 p. Asp175Glufs* (c. 525delC) 突变与在蛋白质水平上发生移码突变及蛋白质截短、受突变影响的氨基酸序列在多种动物中保守存在

Figure 4 Sanger sequencing result and functional analysis of the *PITX2* mutation A: Sanger sequencing peak map of the patients and healthy family members B: Comparison of the relative expression of *PITX2* mRNA between the patients and healthy controls Compared with healthy controls, $^aP < 0.001$ (Independent samples *t* test, $n = 3$) C: The mutation p. Asp175Glufs* 33 (c. 525delC), subsequent *PITX2* protein frameshift mutation and truncation, as well as the amino acid sequence affected were conservative

3 讨论

本研究首次在中国人中报道 *PITX2* 基因移码突变 c. 525delC (p. Asp175Glufs*), 证实 *PITX2* 致病突变与 ARS 发病相关。在眼部, 该基因突变除与 ARS 相关外, 还与虹膜发育不良、虹膜房角发育异常综合征、Peters 异常、角膜皮样环相关^[9-11], *PITX2* 致病基因突变也见于无眼部表现的牙齿发育异常者、先天性心脏病或房颤患者^[12-15]。*PITX2* 突变引起的表型多样性原因可能包括: (1) ARS 患者也可出现牙齿和心脏异常, 因此表型的不完全外显可能是导致临床差异的原因; (2) 各患者的遗传背景有差异, 如体内其他基因 SNP 的存在改变了患者对某些疾病表型的易感性, 进而造成表型差异。在已报道的 ARS 家系中, 患者眼部表型几乎全部外显, 本研究中患者也均出现眼部异常及相似的牙齿和脐部发育缺陷, 疾病累及部位无差异, 仅严重程度表现不同。然而在个别 ARS 家系中, 具有相同 *PITX2* 基因突变的患者疾病累及部位不尽相

同^[16], 推测在同一家系中出现的表型异质性可能与患者间的遗传背景差异有关。因此, 在 ARS 遗传学研究中, 除关注疾病的致病基因外, 获得 ARS 家系患者其他基因变异数据、分析家系的遗传背景差异, 有望揭示 ARS 患者表型异质性原因及 *PITX2* 致发育异常机制。

目前进行大量基因序列平行测序的高通量测序技术主要为 WES、全基因组测序和靶向基因测序 (target gene sequencing, TGS), 其中 TGS 和 WES 广泛用于单基因遗传病的变异筛查^[17]。TGS 也称 panel 测序, 仅可检测目标基因片段变异, 且 panel 的选择依赖于患者的临床诊断^[18], 而 WES 可以弥补这一点, 适用于致病基因未全部明确的疾病。本研究利用 WES 技术除发现已知 ARS 致病基因 *PITX2* 变异外, 也在其他基因中发现一些可能对蛋白质结构产生影响的罕见突变, 涉及的基因与已知致病基因

PITX2 或 *FOXC1* 具有相似基因功能, 其中 *SIX2* 基因编码蛋白与 *PITX2* 蛋白相互作用, 但目前这些突变的致病性未知, 需要进一步开展以家系为基础的遗传学分析和突变功能研究, 以探讨这些候选基因与 ARS 发病和表型差异的相关性。

ARS 与其他眼相关遗传病一样, 除具有基因座异质性外, 也具有等位基因异质性^[17], ARS 相关 *PITX2* 基因突变在形式上主要为截短突变 (无义突变或移码突变) 和重要功能结构域的错义突变, 目前已报道的变异种类为 100 余种, 其中错义突变和无义突变约 45 种, 碱基插入或缺失约 23 种, 约 4 种突变位于剪接区, 但 *PITX2* 基因突变的形式和位置与患者表型严重程度尚未发现明显相关性, 但与携带 *FOXC1* 基因突变的 ARS 患者表型相比, 携带该基因突变的患者面部、牙齿及肚脐等全身发育异常更为常见^[1]。本研究发现的 c. 525delC (p. Asp175Glufs*) 移码突变改变了脊椎动物中保守存在的氨基酸序列, 并导致 *PITX2* 蛋白末端及其内的 OAR 结构域缺失, 而 *PITX2* 蛋白末端的

OAR 结构及其侧翼共 39 个氨基酸与 PITX2 蛋白的 DNA 结合和转录激活能力相关^[19]。因此, c. 525delC 杂合突变可能作为功能获得性或功能缺失性基因突变改变 PITX2 蛋白功能, 或因翻译形成的突变蛋白具有显性负性突变效应抑制野生型 PITX2 蛋白功能而致病, 也可能通过移码突变介导的 mRNA 降解致 PITX2 基因单倍剂量不足引起 ARS。针对患者体内 PITX2 基因 mRNA 表达水平检测发现, 携带该变异的 ARS 患者 PITX2 mRNA 表达减少, 且生物信息学预测该突变经转录翻译后蛋白质序列减少 118 个氨基酸(截短约 36%), 因此突变 DNA 链转录形成的 mRNA 被降解的可能性大, 但最终能否翻译成功能蛋白及其对机体的影响仍需进一步研究。

综上所述, 本研究利用 WES 技术结合 Sanger 测序在中国北方 ARS 一家系中发现了 PITX2 基因致病杂合突变 c. 525delC (p. Asp175Glufs*), 该变异为首次在中国 ARS 家系中报道。本研究明确了该家系患者临床及遗传诊断, 有助于提供符合疾病特征的诊疗方案, 扩展了中国人 PITX2 基因突变谱, 并强调了 PITX2 在 ARS 形成和发育相关遗传病发生中的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 王琦: 设计试验、实施研究、采集数据、统计分析、论文撰写; 刘鑫娜: 实施研究、采集数据、统计分析、论文修改; 邵正波: 指导设计试验、论文修改; 原慧萍: 提供病例、指导设计试验、论文修改及定稿

参考文献

- [1] Seifi M, Walter MA. Axenfeld-Rieger syndrome [J]. Clin Genet, 2018, 93(6): 1123-1130. DOI: 10.1111/cge.13148.
- [2] Chang X, Wang K. wANNOVAR: annotating genetic variants for personal genomes via the web [J]. J Med Genet, 2012, 49(7): 433-436. DOI: 10.1136/jmedgenet-2012-100918.
- [3] Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J/OL]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1): D607-D613 [2022-03-01]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6323986/. DOI: 10.1093/nar/gky1131.
- [4] Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible [J/OL]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(D1): D362-D368 [2022-03-03]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5210637/. DOI: 10.1093/nar/gkw937.
- [5] Huang DW, Sherman BT, Tan Q, et al. DAVID bioinformatics resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists [J/OL]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(Web Server issue): W169-W175 [2022-03-23]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1933169/. DOI: 10.1093/nar/gkm415.
- [6] Rose R, Golosova O, Sukhomlinov D, et al. Flexible design of multiple metagenomics classification pipelines with UGENE [J]. Bioinformatics, 2019, 35(11): 1963-1965. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty901.
- [7] Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, et al. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit [J]. Bioinformatics, 2012, 28(8): 1166-1167. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts091.
- [8] 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 [J]. Genet Med, 2015, 17(5): 405-424. DOI: 10.1038/gim.2015.30.
- [9] Xia K, Wu L, Liu X, et al. Mutation in PITX2 is associated with ring dermoid of the cornea [J/OL]. J Med Genet, 2004, 41(12): e129 [2022-03-10]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15591271/. DOI: 10.1136/jmg.2004.022434.
- [10] Kozłowski K, Walter MA. Variation in residual PITX2 activity underlies the phenotypic spectrum of anterior segment developmental disorders [J]. Hum Mol Genet, 2000, 9(14): 2131-2139. DOI: 10.1093/hmg/9.14.2131.
- [11] Doward W, Perveen R, Lloyd IC, et al. A mutation in the RIEG1 gene associated with Peters' anomaly [J]. J Med Genet, 1999, 36(2): 152-155.
- [12] Intarak N, Theerapanon T, Ittiwut C, et al. A novel PITX2 mutation in non-syndromic orofacial anomalies [J]. Oral Dis, 2018, 24(4): 611-618. DOI: 10.1111/odi.12804.
- [13] Sun YM, Wang J, Qiu XB, et al. PITX2 loss-of-function mutation contributes to tetralogy of Fallot [J]. Gene, 2016, 577(2): 258-264. DOI: 10.1016/j.gene.2015.12.001.
- [14] Wei D, Gong XH, Qiu G, et al. Novel PITX2c loss-of-function mutations associated with complex congenital heart disease [J]. Int J Mol Med, 2014, 33(5): 1201-1208. DOI: 10.3892/ijmm.2014.1689.
- [15] Qiu XB, Xu YJ, Li RG, et al. PITX2C loss-of-function mutations responsible for idiopathic atrial fibrillation [J]. Clinics (Sao Paulo), 2014, 69(1): 15-22. DOI: 10.6061/clinics/2014(01)03.
- [16] Perveen R, Lloyd IC, Clayton-Smith J, et al. Phenotypic variability and asymmetry of Rieger syndrome associated with PITX2 mutations [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(9): 2456-2460. DOI: 10.1007/s004170000130.
- [17] 中国眼遗传病诊疗小组, 中国眼科遗传联盟. 眼遗传病基因诊断方法专家共识 [J]. 中华实验眼科杂志, 2018, 36(7): 481-488. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.07.001.
- [18] 李杨. 遗传性眼病致病基因突变分析中应重视临床表型的评估 [J]. 中华实验眼科杂志, 2017, 35(8): 673-676. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.08.001.
- [19] Li Y. Clinical phenotype assessment is very important in mutation analysis for patients with hereditary eye disease [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2017, 35(8): 673-676. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.08.001.
- [19] Amendt BA, Semina EV, Alward WL. Rieger syndrome: a clinical, molecular, and biochemical analysis [J]. Cell Mol Life Sci, 2000, 57(11): 1652-1666. DOI: 10.1007/pl00000647.

(收稿日期: 2022-03-25 修回日期: 2022-08-16)

(本文编辑: 刘艳 施晓萌)

读者 · 作者 · 编者

本刊对论文题目的要求

论文题目力求简洁、特异、明确, 能准确反映文章主题和特定内容, 具有可检索性。中文文题一般以 20 个汉字以内为宜, 一般不设副标题, 尽量不用标点符号, 文题中避免使用不为同行熟知的符号、简称、缩略语和商品名。论著文章和综述须有与中文文题含意一致的英文文题。

(本刊编辑部)