

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.01.003

靶向序列捕获联合高通量测序鉴定成人型多囊肾 PKD1 基因新突变*

沙艳伟

厦门大学附属妇女儿童医院/福建省厦门市妇幼保健院男科,福建厦门 361003

摘要:目的 探讨一个成人型多囊肾蛋白激酶 D1(PKD1) 基因新剪切位点突变及临床表型。方法 收集一个成人型多囊肾病家系临床资料,对家系内成员采用靶向序列捕获对 PKD1 基因行高通量测序,并结合文献加以分析。结果 该家系中先证者存在成人型多囊肾 PKD1 基因的 c.12138+1G>A(IVS44) 突变,而在家系内父亲因多囊肾引发尿毒症去世,先证者母亲一代测序结果正常。结论 PKD1 基因剪切位点突变是中国人人群中成人型多囊肾原因之一,丰富了成人型多囊肾 PKD1 基因突变谱。

关键词:成人型多囊肾; 蛋白激酶 D1 基因; 剪切位点突变

中图分类号:R692.12

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)01-0012-03

Target sequence capture combined with high-throughput sequencing for identifying PKD1 gene new mutations in adult polycystic kidney*

SHA Yanwei

Department of Andrology, Affiliated Women and Children's Hospital, School of Medicine, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361003, China

Abstract: Objective To investigate the new splice site mutation of protein kinase D1(PKD1) in adult polycystic kidney and its clinical phenotypes. **Methods** The clinical data of a family with adult polycystic kidney disease were collected and the PKD1 gene in his family members conducted the high-throughput sequencing by adopting the target sequence capture. The results were analyzed by combining with the literature. **Results** The c.12138+1G>A(IVS44) mutation of PKD1 gene in adult polycystic kidney existed in the probands of this family. The father of this family died due to uremia caused by polycystic kidney. The mother's generation sequencing results of the probands were normal. **Conclusion** The PKD1 gene splice site mutation is one of the causes of adult polycystic kidney in the Chinese population and enriches the PKD1 gene mutation spectrum of adult polycystic kidney.

Key words: adult polycystic kidney; protein kinase D1 gene; splice site mutation

常染色体显性遗传性多囊肾病(ADPKD)是最常见的遗传性肾脏疾病,患者多在成年后发病,群体中发病率为 1/1 000^[1]。ADPKD 是由蛋白激酶 D1(PKD1)(约 85% 的病例)或蛋白激酶 D2(PKD2)(约 15% 的病例)突变引起的^[2]。PKD1 基因定位于 16 号染色体的短臂上(16p13.3),由 51 个外显子组成。cDNA 编码区是由 12 912 个核苷酸(NM_001009944.2)组成,并编码 4 303 个氨基酸^[3]。PKD1 基因编码的多囊蛋白-1(PC1)水平降低可导致 ADPKD 的临床特征^[4]。囊肿的发生和扩大是由于管状细胞增殖和凋亡之间的平衡紊乱、膜蛋白细胞极性的改变、细胞外基质缺陷、异常的液体分泌和纤毛功能异常引起的,从而导致肾脏增大、间质纤维化^[5]。本研究采用高通

量靶向基因捕获测序发现 PKD1 基因新剪切位点突变,通过家系病史和文献分析,确定 PKD1 突变为致病基因,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 1 个 ADPKD 家系(图 1)。先证者(Ⅱ1),女,36 岁,结婚 10 年,因其“多囊肾”避孕至今未生育,2019 年 3 月就诊于本科室进行生殖遗传咨询。超声检查提示:肾脏超声可见双肾体积及形态正常,肾实质内出现无数个大小不一的无回声区(图 2),最大的为 1.6 cm×1.3 cm,集合系统未见异常。先证者父亲因多囊肾导致肾衰竭、尿毒症,已去世。本研究经医院伦理委员会审批通过,患者及家属均已签署知情同意书,在本院行靶向序列捕获联合高通量

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81871200)。

作者简介:沙艳伟,男,副主任医师,主要从事生殖与遗传方面的研究。

本文引用格式:沙艳伟.靶向序列捕获联合高通量测序鉴定成人型多囊肾 PKD1 基因新突变[J].检验医学与临床,2021,18(1):12-14.

测序,并进行基因检测和分析。

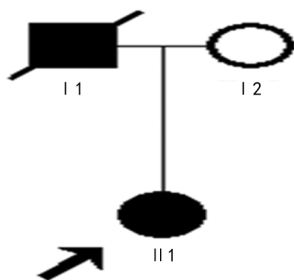


图 1 患者家系图



图 2 患者肾脏超声图

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 抽取受试者及对照者静脉血 2 mL,按照试剂盒(QIAamp DNA Blood Midi Kit, Qiagen, Hilden, 德国)流程提取基因组 DNA。

1.2.2 目标序列捕获与测序 利用 Covaris LE220 超声波仪(Massachusetts, 美国)将基因组 DNA 打断成 200~250 bp 的片段,随后进行 Ampure Beads 纯化,将纯化后的 DNA 片段进行末端修复、加“A”以及加接头反应,从而完成单个患者的 DNA 建库。Non-Captured 样品进行连接介导 PCR(LM-PCR),纯化,利用定制的基因片段捕获芯片(Roche NimbleGen, Madison, USA),与 10~20 个标记好的患者 DNA 库 47 °C 杂交 64~72 h,杂交结束后进行芯片的洗涤和洗脱反应,随后进行 Captured 样品的 LM-PCR 反应。文库经 Agilent 2100 Bioanalyzer 和 ABI StepOne 进行片段大小、浓度、富集度的检测,最后利用高通量测序仪 Illumina HiSeq2500 Analyzers(Illumina, San Diego, USA)连续双向测序 90 个循环,用 Illumina Pipeline software (version 1.3.4) 读出原始测序数据^[6]。

1.2.3 序列分析 数据下机后进入信息分析部分。首先对下机的原始数据(raw reads)进行测序质量评估,去除低质量以及被接头污染的 reads。随后用 BWA 软件(Burrows Wheeler Aligner)^[7]与 HG19 进行序列比对,与此同时进行序列捕获效果评价,用 SOAPsn^[8]软件和 Samtools^[9]软件分别进行单核苷酸变异(SNV)和插入缺失(Indel)的查询,生成目标区域碱基多态性结果,随后进行数据库(NCBI dbSNP,

HapMap, 1000 human genome dataset 和 database of 100 Chinese healthy adults)的比对,并对找出的可疑突变进行注释、筛选^[6]。

1.2.4 Sanger 测序 对于所发现的致病突变,在其所在片段上、下游设计引物,进行 PCR 扩增,对产物做 Sanger 测序,所得结果与 PKD1 基因标准序列 GRCh37/hg19 进行比对,从而验证基因芯片捕获和高通量测序的结果。

2 结果

2.1 基因测序结果 先证者(II 1)血标本行 PKD1、PKD2 和多囊性肝肾疾病 1(PKHD1)基因的全部外显子、外显子与内含子交界区行靶向捕获及高通量测序,结果为先证者 PKD1 基因存在剪切位点突变,即 c. 12138+1G>A 杂合突变(图 3)。因其父亲因多囊肾去世,无法验证,其母亲未见 PKD1 基因上存在 c. 12138+1G>A 杂合突变,与 Sanger 测序验证结果一致,同时查阅人类基因突变数据库专业版及特异性位点突变数据库未见 PKD1 基因上存在 c. 12138+1G>A 杂合突变。

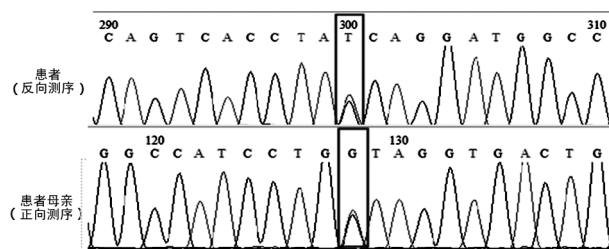


图 3 患者及其母亲 Sanger 测序图

2.2 突变致病性分析 通过在 ExAC 数据库中搜索 c. 12138+1G>A 位点的等位基因频率,笔者发现该位点变异的频率极低,为 0.000 008 689,因此该位点是极为罕见的突变位点,也暗示其致病性。该剪接位点突变可能引起两种剪接改变,第一种由于 c. 12138+1G>A 位点突变后,其所在的内含子无法被剪接,因此该段内含子保留下来,使得 c. 12138 之后的序列导致移码,形成新蛋白 p. Leu4047Valfs * 179;第二种可能的剪接方式为将 c. 12138+1G>A 位点旁的外显子与该位点所在的内含子一起被当作内含子剪接下来,导致 c. 12004_12138del;p. 4002_4046del。因此无论采取哪种剪接方式,均会对 PKD1 蛋白的功能造成严重影响。

3 讨论

ADPKD 的临床特征是在肾脏中形成并生长出充满液体的囊肿,这些囊肿压迫邻近的肾小管,导致肾损伤和纤维化。ADPKD 致病基因有 PKD1、PKD2 和 PKD3。本研究对先证者进行这 3 个基因的测序检测,发现 PKD1 基因存在 c. 12138+1G>A 剪切突变,该突变位点目前尚未见报道。该位点在健康人群

中突变概率极低。ADPKD 的分子机制较为复杂,涉及多种信号通路失调和多种细胞过程的畸变,包括细胞增殖、液体分泌增加、细胞凋亡和肾小管上皮细胞不完全分化等^[8]。PC1 是由 PKD1 编码的大蛋白质,具有多个跨膜结构域,以及细胞外区域,提示细胞—细胞或细胞—基质中的相互作用,细胞内结构域提示信号转导中的作用,并且可与多囊蛋白-2(PC2)相互作用。PC2 相对分子质量较小,具有跨膜结构域,可作为具有钙通透性的阳离子通道,并可调节 PC1,这些蛋白质及与囊性肾病相关的许多其他蛋白质均定位于原始纤毛,这充当了肾脏中的流量传感器作用^[9];大多数纤毛相关基因突变会导致肾囊性疾病^[10]。有研究显示初级纤毛由 Hedgehog (Hh)介导信号传导,其以组织依赖性方式调节细胞增殖和分化^[11]。在规范的途径中,Hh 配体与纤毛上 Hh 受体蛋白 Patched-1 (PTCH1) 结合,激活 Smoothed (SMO)信号传感器,该信号最终转导到胶质瘤(GLI)信号转录因子的下游,该转录的中介体也调节纤毛^[12]。纤毛的形成依赖于一种纤毛特有的纤毛内转运蛋白(IFT)运输系统,IFT 复合体沿着纤毛的轴丝双向运动,运输纤毛形成和维持所需要的物质,在小鼠模型中,大多数 IFT-B 蛋白的丢失导致纤毛缺失或发育迟缓和无法应答 Hh 信号^[10]。相反,IFT-A 蛋白缺失,导致在纤毛的远端末端球状结构中的蛋白质累积和增强 Hh 通路的激活^[13-14]。在肾脏或胚胎发育晚期中 IFT-B 或 A 基因缺失会导致肾囊肿^[15]。PKD1 基因突变导致的多囊肾为常染色体显性遗传,患者生育后代有 50% 的概率遗传并致病,如本例患者生育可选择产前诊断或植入前遗传学诊断预防后代发生多囊肾。

综上所述,PKD1 是导致 ADPKD 的常见基因,其致病机制较为复杂,本研究报道了一个 PKD1 新剪切突变位点,为 ADPKD 诊疗提供理论依据。

参考文献

- [1] SHA Y K, SHA Y W, MEI L B, et al. Use of targeted sequence capture and high-throughput sequencing identifies a novel PKD1 mutation involved in adult polycystic kidney disease[J]. *Gene*, 2017, 634: 1-4.
- [2] LANTINGA-VAN LEEUWEN I S, DAUWERSE J G, BAELDE H J, et al. Lowering of Pkd1 expression is sufficient to cause polycystic kidney disease[J]. *Hum Mol Genet*, 2004, 13(24): 3069-3077.
- [3] THEODORAKOPOULOU M, RAPTIS V, LOUTRA-DIS C, et al. Hypoxia and endothelial dysfunction in autosomal-dominant polycystic kidney disease [J]. *Semin Nephrol*, 2019, 39(6): 599-612.
- [4] WEI X, JU X, YI X, et al. Identification of sequence variants in genetic disease-causing genes using targeted next-generation sequencing [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (12): e29500.
- [5] LI H, DURBIN R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(14): 1754-1760.
- [6] LI R, LI Y, FANG X, et al. SNP detection for massively parallel whole-genome resequencing [J]. *Genome Res*, 2009, 19(6): 1124-1132.
- [7] LI H, HANDSAKER B, WYSOKER A, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(16): 2078-2079.
- [8] TORRES V E, HARRIS P C. Mechanisms of disease: autosomal dominant and recessive polycystic kidney diseases [J]. *Nat Clin Pract Nephrol*, 2006, 2(1): 40-55.
- [9] GHATA J, COWLEY B J. Polycystic kidney disease [J]. *Compr Physiol*, 2017, 7(3): 945-975.
- [10] KO J Y. Functional study of the primary cilia in ADPKD [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 933: 45-57.
- [11] SILVA L M, JACOBS D T, ALLARD B A, et al. Inhibition of hedgehog signaling suppresses proliferation and microcyst formation of human autosomal dominant polycystic kidney disease cells [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 4985-4990.
- [12] ROHATGI R, MILENKOVIC L, SCOTT M P. Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium [J]. *Science*, 2007, 317(5836): 372-376.
- [13] QIN J, LIN Y, NORMAN R X, et al. Intraflagellar transport protein 122 antagonizes sonic hedgehog signaling and controls ciliary localization of pathway components [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(4): 1456-1461.
- [14] TRAN P V, HAYCRAFT C J, BESSCHETNOVA T Y, et al. THM1 negatively modulates sonic hedgehog signal transduction and affects retrograde intraflagellar transport in cilia [J]. *Nat Genet*, 2008, 40(4): 403-410.
- [15] JONASSEN J A, SANAGUSTIN J, BAKER S P, et al. Disruption of IFT complex A causes cystic kidneys without mitotic spindle misorientation [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23(4): 641-651.

(收稿日期:2020-02-14 修回日期:2020-10-28)