

家族性渗出性玻璃体视网膜病变家系的遗传学分析和产前诊断

何凤娟 毛秀珍*

(宿迁市第一人民医院 产前诊断中心, 江苏 宿迁 223800)

【摘要】 目的 对 1 例罕见家族性渗出性玻璃体视网膜病变病例进行遗传学分析, 以确定其致病原因并对该家系胎儿进行产前诊断。方法 应用家系全外显子测序对一个家族性渗出性玻璃体视网膜病变病例进行检测, 通过生物信息学分析, 以确定其致病原因, 并对变异位点进行 Sanger 测序验证, 并对胎儿进行遗传咨询和产前诊断。结果 先证者在 *KIF11* 基因的第 9 外显子存在 c. 1093delG(p. Val365*) 的移码变异, 根据 ACMG 相关指南进行评级, 提示该变异为致病性突变, 可能是先证者患病的主要原因; 该家系的正常个体及胎儿均未检测到该变异。结论 *KIF11* 基因的 c. 1093delG(p. Val365*) 变异在以往的研究中未见报道, 丰富了 *KIF11* 基因的变异谱, 并对该家庭再生育提供遗传咨询和产前诊断。

【关键词】 家族性渗出性玻璃体视网膜病变; *KIF11* 基因; 产前诊断; 全外显子测序

【中图分类号】 R715.5 **【文献标识码】** A

Genetic analysis and prenatal diagnosis of a Chinese pedigree with familial exudative vitreoretinopathy

He Fengjuan, Mao Xiuzhen*

(Prenatal Diagnosis Center of Suqian First People's Hospital, Suqian 223800, Jiangsu, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the genetic etiology for a Chinese pedigree affected with familial exudative vitreoretinopathy. **Methods** A FEVR pedigree was detected by whole exome sequencing (WES). Candidate variant was validated by Sanger sequencing and bioinformatics analysis, prenatal diagnosis and genetic counseling for the once again fetus. **Results** The WES results showed that the proband has harbored a frameshift variation c. 1093delG (p. Val365*) of exon 9 in *KIF11* gene. Based on guidelines from the American College of Medical Genetics (ACMG), the variation was predicted as pathogenic. Sanger sequencing confirmed that the variation was not detected in the normal individuals and the fetus of the family. **Conclusion** The frameshift variation c. 1093delG (p. Val365*) of *KIF11* gene was reported for the first time been reported in previous studies, which enriches the mutation spectrum of *KIF11* gene. This study expanded the mutation spectrum of *KIF11* gene.

【Key words】 Familial exudative vitreoretinopathy; *KIF11* gene; Prenatal diagnosis; Whole exome sequencing

家族性渗出性玻璃体视网膜病变 (familial exudative vitreoretinopathy, FEVR, MIM # 133780, # 305390, # 601813, # 613310) 是一种遗传性的由

视网膜血管发育障碍导致的视网膜不完全血管化和血管分化不良的疾病。迄今为止, 大约 50% 的 FEVR 的临床病人主要有 4 个与 Wnt 通路相关的基因, 分别为 *NDP*、*FZD4*、*LRP5* 以及 *TSPAN12*^[1-2] 等。Ostergaard^[2] 等在 2012 年确定了小头畸形、淋巴水肿、脉络膜视网膜发育异常个体中的 *KIF11* 基因存在变异, 研究者们通过在 FEVR 病人的基因筛

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2024.03.004

基金项目: 宿迁市“宿迁英才”群英计划青年资助项目([2022]QNXM-0050); 宿迁市科技计划资助项目(K202212)

* 通信作者: 毛秀珍, E-mail: 3227405498@qq.com

查中发现并证实了 *KIF11* 基因的变异具有致病性,并通过家系分析证明其为常染色体显性遗传^[2-4]。在本研究中应用家系全外显子测序技术(trio whole exome sequencing, trio WES)对一个 FEVR 患者及其家系进行检测以明确其致病原因,并对胎儿进行遗传咨询和产前诊断。

1 资料与方法

1.1 研究资料 选取2022年9月在宿迁市第一人民医院产前诊断中心就诊的一个 FEVR 综合征家系(图1)。先证者 II 1,男,5岁,42⁺²周剖宫产,出生时无缺氧和黄疸。患儿于4岁视力检查表现为散光合并远视,眼底检查发现视网膜皱褶,符合家族性渗出性玻璃体视网膜病变;5岁体检还发现头围47.2cm(-2SD),语言发育落后,智力发育迟缓。患儿母亲25岁,父亲25岁,表型均正常,否认家族病史,否认近亲结婚。2022年再次妊娠,于孕24⁺⁴周产检超声提示双顶径55mm,头围212mm,腹围187mm,股骨长46mm,测量数据发现腹围和股骨长符合孕周,双顶径和头围符合22⁺孕周,偏小近2周,经遗传咨询医生综合评估和孕妇的要求,进行产前诊断。考虑胎儿孕周超过24周,经遗传咨询并签署知情同意后,同时进行染色体层面和单基因层面的遗传学检测。采取先证者和父母外周血2ml,超声引导下抽取胎儿羊水20ml,提取基因组DNA,对II 2行产前微阵列芯片检测,评估胎儿超声头围偏小是否为染色体问题;对家系成员和胎儿行全外显子测序,分析先证者患病的分子遗传学病因,同时评估胎儿是否携带致病性变异。本研究获得医院伦理委员会批准[伦审第(KYSB20220019)号]。

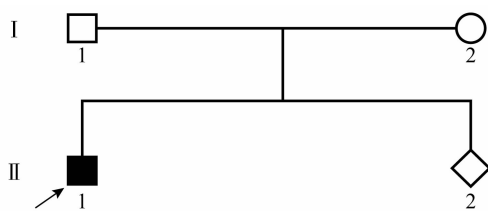


图1 家族性渗出性玻璃体视网膜病变家系图

1.2 方法

1.2.1 染色体微阵列分析 对胎儿羊水脱落细胞

提取基因组DNA样本,实验操作严格按照 CytoScan750K 标准操作程序进行,用 Affymetrix CytoScan™ 750K (Thermo Fisher Scientific, USA) 进行全基因组扫描,应用 Affymetrix Chromosome Analysis Suite (ChAS) 结合 DGV、ClinGene、DECIPHER、ISCA、OMIM 等公共数据库,分析拷贝数变异(copy number variations, CNVs),采用美国医学遗传学与基因组学学会(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)的指南进行变异致病性分析。

1.2.2 家系全外显子测序和致病性变异筛选与验证 采用家系成员联合分析的方法对先证者、胎儿以及父母进行全外显子检测分析,将提取的基因组DNA打断,构建基因组文库。通过 Roche KAPA Hyper Exome 芯片对目标基因(约20,000个)外显子及毗邻剪接区域(约20bp)的DNA进行捕获和富集。应用 MGISEQ-2000 测序平台进行测序,通过 BWA 软件和 UCSC hg19 人类基因组参考序列进行比对,去除重复片段。使用 GATK 进行碱基质量值校正 SNV、INDEL 和基因变异位点,并使用 Exome Depth 进行外显子水平的拷贝数变异检测,寻找与临床表型相关的变异位点。变异位点在经过千人基因组、ExAC、gnomAD 等人群变异频率数据库;ClinVar、OMIM 和 HGMD 等位点和疾病数据库;SIFT、PolyPhen2、Mutation Taster 等突变功能预测数据库进一步进行筛选和注释。获得与先证者表型相关的基因变异位点,并同时家系所有其他成员DNA样本进行 Sanger 测序验证。该基因变异的致病性分类通过美国医学遗传学与基因组学学会(ACMG)致病性标准分类进行致病性评估。

2 结果

2.1 染色体微阵列分析 Affymetrix CytoScan 750K 芯片检测结果显示胎儿在全染色体组范围内未发现具有明确致病效应的染色体片段拷贝数异常。

2.2 全外显子测序和致病性变异筛选与验证

2.2.1 家系全外显子测序结果 通过家系全外显子测序分析并同时 Sanger 测序验证,发现先证者存在 *KIF11* 基因(NM_004523.3)第9外显子的

c. 1093delG(p. Val365*) (图 2)。家系中的正常个体和胎儿未发现以上变异。

2.2.2 Sanger 测序结果 针对 *KIF11* 基因变异位点设计引物,序列为 F: 5' TCCTAAGGGTCGA GACTCTGAAA 3', R: 5' AAGCCTTCCATGGG CAATTT 3', 片段总长 427bp。应用 PCR 反应扩

增目标片段,反应条件为:预变性,95℃ 5min;变性,95℃ 30s,退火,60℃30s,延伸,72℃ 30s,共 30 个循环;72℃延伸 10min。扩增产物经琼脂糖凝胶验证符合目标片段大小,对 PCR 产物进行测序,发现仅有先证者携带该变异,先证者父母不携带该变异,且胎儿也不携带该变异(图 2)。

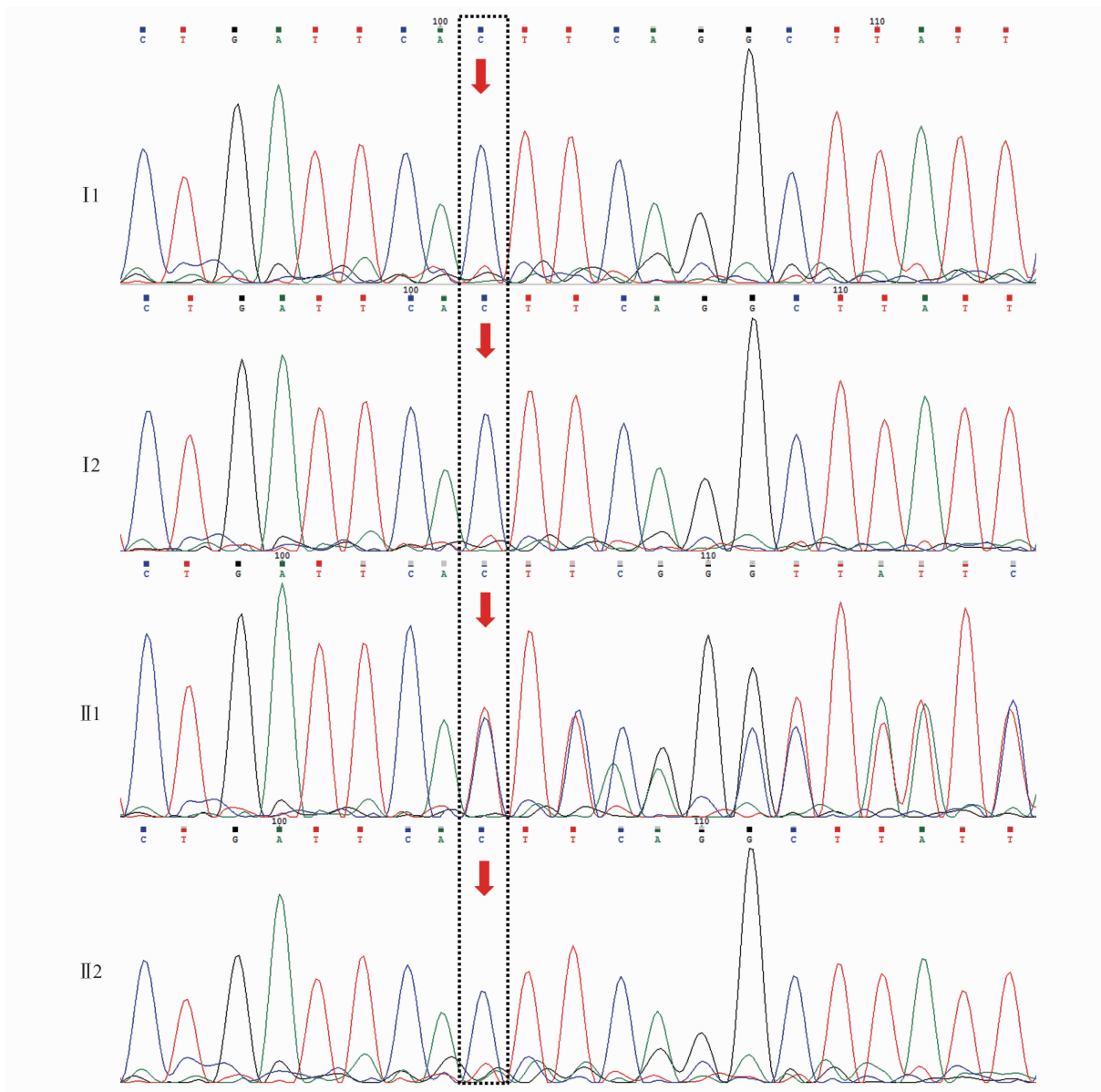


图 2 FEVR 家系 *KIF11* 基因 Sanger 测序结果

2.3 致病性分析

2.3.1 有害性预测 c. 1093delG(p. Val365*) 的变异会导致第 365 位的缬氨酸变为终止密码子,形成了一个仅有 365 个氨基酸的肽链;变异后 *KIF11* 蛋白缺失了两个主要功能域,文献报道,该蛋白在

470 位、525 位以及 744 位等发生无义突变而导致蛋白失去尾部连接区从而致病^[4],本变异造成的缺失氨基酸残基更多,更加确定其变异的致病性(PVS1)。

2.3.2 人群频率和疾病数据库查询 c. 1093delG (p. Val365*) 的变异在千人基因组、ESP 数据库、

ExAC、gnomAD 等数据库的正常和对照人群中均未发现(PM2)。

2.3.3 家系中变异与疾病分析 家系检测发现,仅先证者携带 c. 1093delG(p. Val365*)的变异,家系其他成员未检测到该变异(PS2)。

综合以上证据,根据 ACMG 致病性标准分类指南,c. 1093delG(p. Val365*)变异评级为致病性变异(PVS1,PS2,PM2)。

2.4 胎儿产前诊断结果分析 根据染色体微阵列分析胎儿未发现具有明确致病效应的染色体片段拷贝数异常,全外显子测序和 Sanger 测序验证证明胎儿在 *KIF11* 基因未发现 c. 1093delG(p. Val365*)的变异(图 2),且未检测到其他与表型相关的致病性变异。根据遗传咨询原则,建议继续妊娠,于 2022 年 12 月 15 日剖宫产一女婴,出生体重 3350g,表型正常,随访未见其他异常。

3 讨论

KIF11 基因(MN_004523)位于人类染色体 10q23.33,共有 22 个外显子,编码一个 1056 个氨基酸组成的 Eg5 驱动蛋白,该蛋白是人类驱动蛋白家族中的重要一员,它通常以四聚体的形式参与微管滑动和有丝分裂过程中的纺锤体形成^[6,7]。Eg5 蛋白单体包含一个高度保守的 N 末端动力结构域、中心螺旋-螺旋连接结构域和 C 末端带正电荷的氨基酸残基的保守序列的尾部区,在尾部区还有一个 BimC box 结构域^[8,9]。功能四聚体由四个同源单体以反平行的方式排列而组成,因此所产生的分子在中心柄的两端具有两个运动域和两个非运动尾部。Eg5 与微管的接触是通过 C 末端尾部建立起来的,而随后的反平行微管的滑动则是由 N 末端的动力结构域驱动的^[10]。研究者发现 *KIF11* 基因在小鼠胚胎发育过程中广泛表达,并在增殖组织中明显升高,在 *KIF11* 基因纯合变异的动物体内表现为在胚胎的第 2.5 天就表现出增殖缺陷,并导致早期胚胎的死亡^[11,12]。同时有研究者证明 Eg5 蛋白的功能丧失会阻碍视网膜色素上皮细胞的正常发育^[13],体外实验发现在小鼠视网膜中 *KIF11* 蛋白染色显示,其主要位于视网膜色素上皮感光层^[15];抑制 Eg5 蛋白表达会导致神经元突触生长较快但功能异常,神经的缺陷可能影响视网膜色素上皮细胞的正常功能^[14,15]。

FEVR 是一种以先天性视网膜血管系统发育异

常的遗传性疾病,*KIF11* 基因是该疾病的一个重要致病基因,在以往的报道中,FEVR 患者中 *KIF11* 基因变异占该疾病基因变异总量的 2%~8%^[3,4,16-19]。以往发现在 *KIF11* 基因上的变异约有 53 种:其中移码变异有 21 种,占总变异数的 38.9%(21/54);无义变异有 15 种,占总变异数的 27.8%(15/54);错义变异有 10 种,占总变异数的 18.5%(10/54);发生在内含子区域或引起剪接错误的变异有 6 种,占总变异数的 11.1%(6/54);另外还有一个是插入 2 个碱基引起的变异。其中本报道中发现的变异是无义变异,该变异缺失了碱基位点后,使该位点的翻译密码子变为了终止密码,使蛋白在第 365 位提前终止,经过分析引起蛋白氨基酸序列变为终止密码子的变异共有 15 种,变异位点发生在 365 位之后的有 9 例,发生位点最靠近尾端的是发生在第 955 位的氨基酸点突变引起的无义变异也导致疾病的发生^[18]。可见 *KIF11* 蛋白的 C 末端区域在蛋白功能的发挥中起到重要的作用,进一步证明了 *KIF11* 基因 c. 1093delG(p. Val365*)变异的致病性。在 *KIF11* 基因变异引起的 FEVR 通常伴有智力和生长发育的落后、小头畸形等^[20],这些症状在先证者也有表现。

本研究应用全外显子测序技术,发现先证者在 *KIF11* 基因第 9 外显子存在 c. 1093delG (p. Val365*)的移码变异,导致其蛋白质第 365 位氨基酸由缬氨酸变为了终止密码子,查阅文献发现,该变异未见报道。根据家系全外显子检测结论通过 Sanger 测序对家系成员进行验证,家系内先证者存在 c. 1093delG (p.Val365*)变异,而家系中的 I 1、I 2 和 II 2 的胎儿均未发现该变异,证实该变异与症状存在共分离。胎儿不携带该变异,染色体微阵列芯片检测未发现明确致病效应的变异,因而选择继续妊娠。对胎儿后续生长发育过程进行监测发现,该胎儿双顶径和头围随孕周增长正常,该胎儿孕期各项超声监测发育过程符合相应过程,于 38⁺5 周剖宫产一健康女婴。

综上所述,本研究利用家系全外显子测序技术在一个家族性渗出性玻璃体视网膜病变家系中发现,先证者携带未见报道的 *KIF11* 基因 c. 1093delG 移码无义变异,通过分析确定其为先证者发生 FEVR 的遗传学病因。为排除胎儿患有该遗传性疾病或其他染色体病,本中心对该家系中的母亲进行遗传咨询和产前诊断,确定了胎儿不携带该

变异,避免了出生缺陷儿的出生,减少了孕妇及家庭的困扰。该基因引起的 FEVR 通常伴有小头畸形和智力以及生长发育的落后,当孕期超声提示持续性出现双顶径和头围的发育落后等表型,可进行全外显子检测,以排除相关单基因病的出现。

参 考 文 献

- [1] SALVO J, LYUBASYUK V, XU M, et al. Next-Generation Sequencing and Novel Variant Determination in a Cohort of 92 Familial Exudative Vitreoretinopathy Patients [J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2015, 56(3):1937-1946.
- [2] SEO S H, YU Y S, PARK S W, et al. Molecular characterization of FZD4, LRP5, and TSPAN12 in familial exudative vitreoretinopathy [J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2015, 56(9):5143-5151.
- [3] OSTERGAARD P, SIMPSON M A, MENDOLA A, et al. Mutations in KIF11 cause autosomal-dominant microcephaly variably associated with congenital lymphoedema and chorioretinopathy [J]. *The American Journal of Human Genetics*, 2012, 90(2):356-362.
- [4] ROBITAILLE J M, GILLET R M, LEBLANC M A, et al. Phenotypic overlap between familial exudative vitreoretinopathy and microcephaly, lymphedema, and chorioretinal dysplasia caused by KIF11 mutations [J]. *JAMA Ophthalmology*, 2014, 132(12):1393-1399.
- [5] LI J K, FEI P, LI Y, et al. Identification of novel KIF11 mutations in patients with familial exudative vitreoretinopathy and a phenotypic analysis [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1):26564.
- [6] VALENTINE M T, FORDYCE P M, KRZYSIK T C, et al. Individual dimers of the mitotic kinesin motor Eg5 step processively and support substantial loads in vitro [J]. *Nature Cell Biology*, 2006, 8(5):470-476.
- [7] JONES G E, OSTERGAARD P, MOORE A T, et al. Microcephaly with or without chorioretinopathy, lymphoedema, or mental retardation (MCLMR): review of phenotype associated with KIF11 mutations [J]. *European Journal of Human Genetics*, 2014, 22(7): 881-887.
- [8] SAWIN K E, MITCHISON T J. Mutations in the kinesin-like protein Eg5 disrupting localization to the mitotic spindle [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995, 92(10):4289-4293.
- [9] RAPLEY J, NICOLÁS M, GROEN A, et al. The NIMA-family kinase Nek6 phosphorylates the kinesin Eg5 at a novel site necessary for mitotic spindle formation [J]. *Journal of Cell Science*, 2008, 121(23):3912-3921.
- [10] WEINGER J S, QIU M, YANG G, et al. A Nonmotor Microtubule Binding Site in Kinesin-5 Is Required for Filament Crosslinking and Sliding [J]. *Current Biology*, 2011, 21(2): 154-160.
- [11] CASTILLO A, JUSTICE M J. The kinesin related motor protein, Eg5, is essential for maintenance of pre-implantation embryogenesis [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 357(3): 694-699.
- [12] CHAUVIÈRE M, KRESS C, KRESS M. Disruption of the mitotic kinesin Eg5 gene (Kns1) results in early embryonic lethality [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 372(4): 513-519.
- [13] WANG Y, ZHANG Z, HUANG L, et al. Update on the Phenotypic and Genotypic Spectrum of KIF11-Related Retinopathy [J]. *Genes*, 2022, 13(4):713.
- [14] TAYLOR R L, PARRY N R A, BARTON S J, et al. Panel-Based Clinical Genetic Testing in 85 Children with Inherited Retinal Disease [J]. *Ophthalmology*, 2017, 124(7): 985-991.
- [15] BAAS P, MATAMOROS A. Inhibition of kinesin-5 improves regeneration of injured axons by a novel microtubule-based mechanism [J]. *Neural Regeneration Research*, 2015, 10(6): 845-849.
- [16] KONDO H, MATSUSHITA I, NAGATA T, et al. Retinal Features of Family Members With Familial Exudative Vitreoretinopathy Caused By Mutations in KIF11 Gene [J]. *Translational Vision Science & Technology*, 2021, 10(7):18.
- [17] KARJOSUKARSO D W, CREMERS F P M, VAN NOUHUYS C E, et al. Detection and quantification of a KIF11 mosaicism in a subject presenting familial exudative vitreoretinopathy with microcephaly [J]. *European Journal of Human Genetics*, 2018, 26(12): 1819-1823.
- [18] HU H, XIAO X, LI S, et al. KIF11 mutations are a common cause of autosomal dominant familial exudative vitreoretinopathy [J]. *British Journal of Ophthalmology*, 2016, 100(2): 278-283.
- [19] CHEN C, SUN L, LI S, et al. Novel variants in familial exudative vitreoretinopathy patients with KIF11 mutations and the Genotype-Phenotype correlation [J]. *Experimental Eye Research*, 2020, 199:108165.
- [20] GUO Z, HUO X, WU D, et al. A novel variant of the KIF11 gene, c. 2922G > T, is associated with microcephaly by affecting RNA splicing [J]. *Developmental Neuroscience*, 2022, 44(2): 113-120.

(收稿日期:2024-06-02)

编辑:姚红霞