

TMEM67 基因突变所致的 Joubert 综合征一家系及临床遗传学分析

李陈¹ 魏然¹ 王逾男¹ 何薇¹ 赵馨¹ 丁红珂¹ 杨朝湘² 卢建¹ 尹爱华^{1*}

(1. 广东省妇幼保健院 医学遗传中心, 广东 广州 510010; 2. 广东省妇幼保健院 医学影像科, 广东 广州 510010)

【摘要】 **目的** 利用二代测序技术结合 Sanger 测序验证对一临床诊断为 Joubert 综合征的家系进行致病基因检测。**方法** 以 2015 年广东省妇幼保健院产前诊断科诊断为 Joubert 综合征的一家系为研究对象, 采集先证者胎儿病史、影像学检查结果及家族史, 采用全外显子高通量测序方法, 对先证者胎儿及其父母进行基因检测, 后对发现的致病位点进行 Sanger 测序验证。**结果** 检测到先证者在 TMEM67 基因第 12 个外显子上发生了错义突变, c. 1175C>G(来源于父亲), 以及在 TMEM67 基因第 12 个外显子上发生了另外一个错义突变, c. 1250A>G(来源于母亲)的双重杂合改变, 符合孟德尔隐性遗传。**结论** 本研究成功利用二代测序技术鉴定了一种导致 Joubert 综合征的新发突变类型, 此位点为国内外首次报道, 丰富了 Joubert 综合征的病因信息。二代测序技术为产前确诊罕见疾病提供一套可行的新方法, 建立基因水平上的堡垒。

【关键词】 Joubert 综合征; TMEM67 基因; 二代测序技术

【中图分类号】 R714.55 **【文献标识码】** A

【Abstract】 **Objective** Using next-generation sequencing (NGS) and Sanger sequencing to detect the novel gene mutation in a Joubert syndrome family. **Method** A family which diagnosed as Joubert syndrome family was enrolled as subject of this study from our outpatients in 2015. Following the medical history, imaging results and family history of the suffering fetus, next-generation sequencing (NGS) and sanger sequencing were used for suffering fetus and its parents to detect and verify the gene mutation causing this disease. **Results** A missense mutation c. 1175C>G (inherited from father), and another missense mutation c. 1250A>G (inherited from father) had been identified in the affected fetus, which had been confirmed to accord with Mendelian inheritance. **Conclusions** We firstly described a mutation in gene TMEM67, which is a novel mutation causing Joubert syndrome. This discovery had enriched the gene information of Joubert syndrome and next-generation sequencing (NGS) provided a practical method for prenatal diagnosis of rare disease.

【Key words】 Joubert syndrome; gene TMEM67; NGS

Joubert 综合征(MIM213300)是一种罕见的以小脑蚓部发育不良(中-后脑畸形)伴发作性呼吸过度、眼球运动障碍、共济失调和智力低下为主要特征的神经系统发育障碍性遗传病,也常与肾脏及肝脏

等内脏发育异常相关^[1]。Joubert 综合征的主要遗传方式为常染色体隐性遗传,少部分为 X 连锁隐性遗传。它的典型神经影像学表现为“磨牙征”^[2]。Joubert 综合征的发病率低,在活产儿中约为 1/100 000~1/80 000^[3]。由于 Joubert 综合征存在临床表现的异质性及致病基因的不明确性,Sanger 测序不

适用于 Joubert 综合征的基因诊断。在二代测序技术(next-generation sequencing, NGS)的推动下,全外显子高通量测序技术发展迅速,NGS 可以通过反复测序同一区域的 DNA 片段,达到很高的灵敏度和准确度,同时能在很短的时间内完成上百亿碱基的测序,效率高,为基因组分析提供了新的方法^[4]。本研究利用全外显子高通量测序技术对一 Joubert 综合征家系进行突变基因检测,并对检测到的突变位点进行 Sanger 测序验证,不仅成功鉴定了一种导致 Joubert 综合征的新突变,丰富了 Joubert 综合征的病因信息,同时为罕见疾病的产前诊断及临床确诊提供了一套可行的新方法。

1 材料与方法

1.1 病历资料

穆某某,40岁,因“外院超声发现胎头变形、双肾增大、羊水过少”于广东省妇幼保健院产前诊断中心就诊。既往史:G5P1A3,既往3次均因“胎儿双肾异常、羊水过少”引产,引产后未行进一步检查。自然流产1次,2006年剖宫产一女婴,健存。现为第5次怀孕,2015年11月11日本院Ⅲ级超声提示:孕25⁺周,胎儿双侧多囊肾声像,严重羊水过少, Dandy-Walker 变异型(图1)。本院 MRI 提示:胎儿小脑蚓部显示不明确,轴位上中脑层面可见“白齿征”,双侧小脑上脚增粗;第四脑室增宽扩大,并与后颅窝池相通。多拟 Joubert 综合征畸形改变(图2)。双侧侧脑室及后颅窝池轻度增宽,双侧婴儿型多囊肾,羊水过少。入院诊断:①胎儿异常;②羊水过少;③遗传咨询(不良孕产史);④高龄孕产妇妊娠监督;⑤瘢痕子宫。本研究家系既往无遗传病家族史,非近亲婚配,夫妇双方均体健。经遗传咨询,夫妻双方知情选择行产前诊断(羊水),行胎儿染色体分析、微阵列分析及全外显子测序检查;夫妇双方同时行外周血染色体测序分析,测序结果均经 Sanger 测序验证。测序及 Sanger 验证结果显示存在致病基因位点,夫妇双方要求引产并行胎儿尸检。本研究家系既往无遗传病家族史,非近亲婚配,夫妇双方均体健。本研究获得了广东省妇幼保健院机构审查委员会及广州医科大学伦理委员会的批准。所有样品的采集均取得了参与者的书面知情同意书。

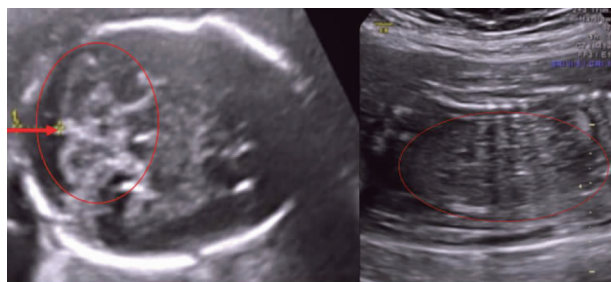


图1 胎儿Ⅲ级超声图像(左图:脑部 Dandy-Walker 变异型;右图:多囊肾)

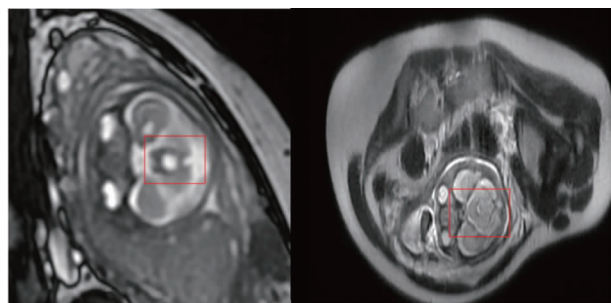


图2 胎儿头颅磁共振图像(小脑蚓部“白齿征”)

1.2 实验方法

1.2.1 羊水及外周血 DNA 提取

用 QIAGEN 公司基因组 DNA 提取试剂盒 QIAGEN DNA Blood Mini Kit 按试剂盒说明书提取羊水及外周血 DNA,使用 Nanodrop2000 超微量分光光度计进行提取 DNA 的定量。

1.2.2 羊水培养及染色体核型分析

常规操作进行羊水细胞原位培养、收获、制片和 G 显带,全自动扫描仪扫描、拍照。按照人类细胞遗传学国际命名体制(ISCN2009)标准进行 G 显带染色体核型分析诊断。必要时加做 C 显带、N 显带;

1.2.3 羊水染色体微阵列分析及 QF-PCR 分析

羊水 DNA 使用 Agilent 公司生产的芯片进行全基因组扫描检测,数据分析参照 DECIPHER、ISCA、0MIM、DGV、UCSC 等数据库。胎儿取材母血 DNA 污染鉴定结果:D13S305、D18S978、D21S11 等 11 个 STR 位点测序分析提示无母体 DNA 污染。

1.2.4 羊水 DNA 二代测序

定制罗氏 NimbleGen 全外显子捕获探针对全外显子区域 DNA 捕获并富集,使用 illumina HiSeq2500 (Illumina, San Diego, CA, USA)进行高通量测序。数据分析:①基本信息分析:去接头污染,去低质量后进行原始

数据产量统计;②使用 BWA 比对软件,将数据与参考序列进行比对统计;③根据测序深度、突变质量,对检测得到的 SNP 进行过滤筛选,得到高质量可靠的突变谱;④筛选出的变异对蛋白功能影响的预测:使用 sIFT、Plophen-2、Mutation Taster 等基于同源比对,蛋白结构的保守性等算法,预测筛选出的变异对蛋白质的影响。

1.2.5 Sanger 测序 根据高通量测序结果用 Sanger 测序对羊水细胞 DNA 及父母外周血 DNA 进行突变位点的检测和验证。采用 Primer5 软件设计引物,扩增 *TMEM67* 基因第 12 个外显子序列。引物序列为: *TMEM67*-E12F: GGGATAACAAGG-TAGTATAAAGACATT, *TMEM67*-E12R: GGG-TCTAAGTCCACCAGCAAT。PCR 扩增条件为: 95°C 5 min, 95°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 5 min, 72°C 30 s, 共进行 38 个循环反应。

2 结果

2.1 脐血染色体核型与染色体微阵列分析 胎儿羊水染色体及微阵列分析未见异常。

2.2 二代测序结果分析 胎儿脐血测序及 Sanger 验证结果显示: *TMEM67* 基因第 12 个外显子上发生了双重错义突变,位点分别为 c. 1175C>G 及 c. 1250A>G。其中 c. 1175C>G 来源于父亲, c. 1250A>G 来源于母亲(图 3)。Mutation Taster 根

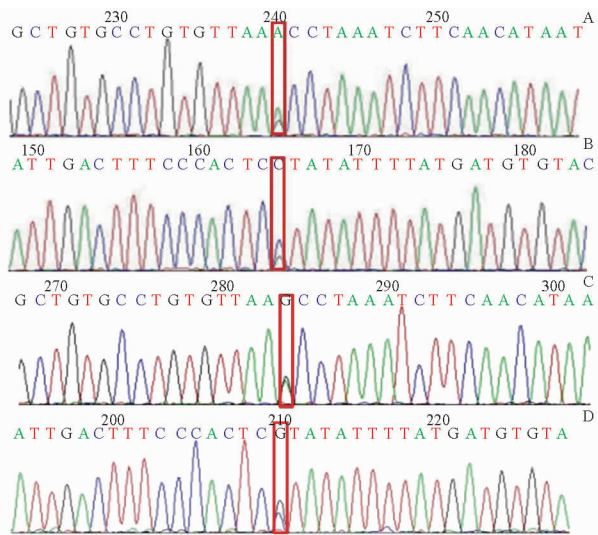


图3 *TMEM67* 基因 Sanger 测序峰图

A、B. 胎儿脐血 *TMEM67* 基因; C. 母方外周血 *TMEM67* 基因;
D. 父方外周血 *TMEM67* 基因

据遗传方式及家系中分布情况推测该位点为疾病相关变异,相关数据库及文献未见报道。*TMEM67* 基因突变与 Joubert 综合征 6 型相关,为常染色体隐性遗传。临床主要表现为精神运动发育迟缓、小脑蚓部发育不良引起的共济失调、肾囊肿、视网膜发育不良等。

2.3 引产后胎儿尸检结果分析 引产后胎儿尸检结果提示:胎儿小脑蚓部完全缺如,心脏室间隔缺损,双肾发育不良伴多囊肾。符合胎儿 Joubert 综合征,符合产前诊断的结果。

3 讨论

Joubert 综合征 (Joubert syndrome, JBTS, 213300) 是一种常染色体隐性遗传病,以小脑蚓部发育不全为特征,伴有低张力、发育迟缓、呼吸模式异常和眼球运动异常。枕叶脑膨出和多指畸形偶有报道。临床上 Brancati 等人^[5]将 Joubert 综合征是否合并其他异常分为 6 型,即单纯型 Joubert 综合征、Joubert 综合征合并眼部异常、Joubert 综合征合并肾脏异常、Joubert 综合征合并眼肾异常、Joubert 综合征合并肝脏异常、Joubert 综合征合并口面指畸形。目前遗传学上根据致病基因不同又将 Joubert 综合征分为 35 种,*TMEM67* 基因异常导致的 Joubert 综合征属于基因分型 JBST6 型,约占 Joubert 综合征的 6%~10%^[6]。

本文我们描述了一对非近亲婚配的夫妇,共怀过 4 次产前超声异常的胎儿。前三胎均在外院行产前检查,提示有“双肾增大、羊水过少”,未行染色体及基因检测。第 5 胎在本院产前超声诊断为脑部 Dandy-Walker 变异型及双侧多囊肾声像、严重羊水过少,胎儿脑部 MRI 见特征性“白齿征”,怀疑 Joubert 综合征。当产前超声及 MRI 发现胎儿结构异常时我们首选染色体核型及微阵列技术检测,因此本文中进行了羊水核型及微阵列检测,结果均为正常。同时根据胎儿特征性 Joubert 综合征可疑脑部异常征象,我们进行了羊水全外显子测序,发现了一种 *TMEM67* 基因的新型双重杂合突变(c. 1175C>G 及 c. 1250A>G),且这两种杂合突变分别遗传自父母,同时表型正常的大女儿仅为杂合子。这两种

杂合突变类型均未被报道过,且此两个变异位点均可引起编码氨基酸的改变。结合该病遗传特性、受检胎儿临床资料及家系基因检测结果,强烈提示两个变异位点为疾病相关变异^[7]。因此,我们考虑 *TMEM67* 基因的双重杂合突变(c. 1175C>G 及 c. 1250A>G)为异常胎儿的致病原因。

基因 *TMEM67* (NC_000008.11)位于染色体 8q21.13-q22.1 位置,全长约 12.67Mb,由 Smith^[8] 2006 年在大鼠中发现。人 *TMEM67* 基因编码一种由 995 个氨基酸组成的蛋白质,称为 Meckelin 蛋白,蛋白质量约 108KD,与小鼠 Meckelin 蛋白有 84% 的同源性。2007 年 Baala 等人^[9]首次在一个近亲家庭中发现 *TMEM67* 基因异常导致的 JBST6,这个家庭两次妊娠都因“超声发现胎儿后颅窝异常及肾脏”增大于孕晚期引产,夫妇双方携带了两种不同的 *TMEM67* 基因突变并遗传给胎儿。后 Dawe 等人^[10]2007 年利用原位杂交技术在人类胚胎中发现,Meckelin 蛋白在肾、肝、视网膜、后脑、蝶骨和脑中中线均有表达。在发育中的肢体软骨中也有很强的表达,尤其是在指(趾)软骨中。同时他们利用免疫组化技术发现,18~20 周龄人胎儿肾脏在近端肾小管上皮细胞中检测到中等至高表达的 Meckelin 蛋白。

TMEM67 基因缺陷可导致多种综合征,包括 RHYNS 综合征、COACH 综合征、Joubert 综合征 6 型(JBST6),Meckel-Bruber 综合征 3 型(MKS3),Bardet-Biedl 综合征 14 型等。由 *TMEM67* 基因异常导致的 JBST6 型往往伴有视网膜营养不良与肾脏异常。2009 年 Otto 等人^[11]在 120 例无血缘关系 JBST 患者中发现 4 例(3.3%)为 *TMEM67* 突变引起。4 例患者均有共济失调、低张力或精神运动迟缓或小脑蚓部发育不良。且 4 例患者均在 8~15 岁期间出现终末期肾病、肝纤维化,同时也有眼部受累,包括失明、视网膜退行性变或视网膜色素瘤。2013 年 Du E 等人^[12]研究表明,*TMEM67* 基因可通过激活 ERK 和 JNK 依赖的信号通路导致肾脏疾病的发生。本文中胎儿出现的主要表现为典型的 JBST 表现脑部“白齿征”及肾脏异常改变,符合 *TMEM67* 基因异常引起的 JBST6 型特征。

通过二代测序技术,我们发现了疾病相关的异常基因改变。随着基因技术的发展,产前诊断越来越多地采用更先进的分子遗传学检测技术,如 CMA 和 NGS。2018 年,ISPD SMFM 和 PQF 就基因测序用于胎儿诊断发表了联合声明,内容包括:对于 CMA 等公认检测方法无法提供有效信息的胎儿,目前可采用测序诊断技术进行胎儿评估^[13]。与该声明一致,我们首先采用染色体核型和 CMA 辅助产前诊断,最终通过二代测序技术确认了 *TMEM67* 的新发复合杂合突变为致病原因。本文表明二代测序技术是对产前诊断十分有帮助和有效的检查,特别是对于临床鉴别诊断模糊的胎儿。为 NGS 应用于产前诊断的适用性提供了有力证据。同时,此 *TMEM67* 的复合杂合突变为首次发现且与 JBST6 相关,这不仅帮助家庭确定和避免未来妊娠的复发风险,同时更对这种罕见疾病提供了更多的基因诊断信息和有更深刻的了解。

综上所述,我们利用二代测序技术首次发现了一种 *TMEM67* 新发复合突变(c. 1175C>G 合并 c. 1250A>G),并且根据基因检测结果及基因型-表型分析,确认此突变为上文所述家系的遗传学病因。后我们的研究表明,二代测序技术是一个能够有助于诊断胎儿产前超声检查异常的遗传学病因的有效技术。在成功找到遗传学病因后,可在下一次生育实现妊娠早期产前诊断及知情选择 PGD 有效避免罕见遗传病的发生。同时我们发现了 Joubert 综合征的一种新发复合突变,丰富了 Joubert 综合征的基因信息。

参 考 文 献

- [1] Saraiva JM, Baraitser M. Joubert syndrome: a review[J]. Am J Med Genet, 1992,43(4):726-731.
- [2] Maria BL, Hoang KB, Tusa RJ, et al. "Joubert syndrome" revisited: key ocular motor signs with magnetic resonance imaging correlation[J]. J Child Neurol, 1997,12(7):423-430.
- [3] Romani M, Micalizzi A, Valente EM. Joubert syndrome: congenital cerebellar ataxia with the molar tooth[J]. Lancet Neurol, 2013,12(9):894-905.
- [4] Tsurusaki Y, Kobayashi Y, Hisano M, et al. The diagnostic utility of exome sequencing in Joubert syndrome and related

- disorders[J]. *J Hum Genet*, 2013,58(2):113-115.
- [5] Brancati F, Dallapiccola B, Valente EM. Joubert Syndrome and related disorders[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2010,5:20.
- [6] Romani M, Micalizzi A, Valente EM. Joubert syndrome, congenital cerebellar ataxia with the molar tooth[J]. *Lancet Neurol*, 2013,12(9):894-905.
- [7] Li MM, Datto M, Duncavage EJ, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists[J]. *J Mol Diagn*, 2017,19(1):4-23.
- [8] Smith UM, Consugar M, Tee LJ, et al. The transmembrane protein meckelin (MKS3) is mutated in Meckel-Gruber syndrome and the wpk rat[J]. *Nat Genet*, 2006,38(2):191-196.
- [9] Baala L, Romano S, Khaddour R, et al. The Meckel-Gruber syndrome gene, MKS3, is mutated in Joubert syndrome[J]. *Am J Hum Genet*, 2007,80(1):186-194.
- [10] Dawe HR, Smith UM, Cullinane AR, et al. The Meckel-Gruber Syndrome proteins MKS1 and meckelin interact and are required for primary cilium formation[J]. *Hum Mol Genet*, 2007,16(2):173-186.
- [11] Otto EA, Tory K, Attanasio M, et al. Hypomorphic mutations in meckelin (MKS3/TMEM67) cause nephronophthisis with liver fibrosis (NPHP11)[J]. *J Med Genet*, 2009,46(10):663-670.
- [12] Du E, Li H, Jin S, et al. Evidence that TMEM67 causes polycystic kidney disease through activation of JNK/ERK-dependent pathways[J]. *Cell Biol Int*, 2013,37(7):694-702.
- [13] International Society for Prenatal Diagnosis; Society for Maternal and Fetal Medicine, Perinatal Quality Foundation. Joint Position Statement from the International Society for Prenatal Diagnosis (ISPD), the Society for Maternal Fetal Medicine (SMFM), and the Perinatal Quality Foundation (PQF) on the use of genome-wide sequencing for fetal diagnosis[J]. *Prenat Diagn*, 2018,38(1):6-9.

(收稿日期:2019-07-29)

编辑:宋文颖