

FOG2 基因在圆锥动脉干发育畸形患者中的外显子突变和拷贝数量变化的研究

邓展涛 章文文 易龙*

(江苏省南京市南京大学 医学分子技术重点实验室,江苏 南京 210093)

【摘要】 目的 了解 FOG2(Friend of GATA4)基因外显子突变在中国圆锥动脉干发育畸形(CTD)病人中情况和比例,以及在 TOF 病人中,检测是否存在 FOG2 基因的拷贝数量变化。方法 在南京市儿童医院收集从 2004 年 1 月到 2006 年 1 月的 199 例 CTD 病人的血样,包括 145 例法洛四联症(TOF),37 例右心室双出口(DORV),17 例大动脉错位(TGA)。100 例健康患者作为对照组,利用一代测序检测 FOG2 基因的外显子突变,利用多重连接探针扩增(MLPA)检测 FOG2 基因的拷贝数量变化。结果 在 6 个 CTD 病人发现了 4 种错义突变,分别在 2 个 DORV 病人中发现了 p. V339I、p. A426T 3 个 TOF 病人中发现了 p. M703L,在 1 个 TOF 病人中发现了 p. T843。总比例为 3.0%。所有的这些突变都并没有在 100 个正常人中发现。MLPA 检测没有发现在 TOF 病人中存在着拷贝数量变化。结论 FOG2 基因的外显子突变在中国 CTD 病人中是相对比较常见的,而 FOG2 基因的拷贝数量变化不是引起 CTD 的原因。但依然需要更大样本的研究来提高我们对 FOG2 基因在 CTD 中的作用的认知。

【关键词】 圆锥动脉干发育畸形;FOG2 基因;突变;拷贝数量变化

【中图分类号】 R714.53 **【文献标识码】** A

doi: 10.13470/j.cnki.cjpd.2014.02.006

【Abstract】 **Objective** To understand the role of FOG2 gene in patients with conotruncal heart defect and find exon mutations and copy number variants of FOG2 gene. **Method** From January 2004 to January 2006, blood samples were collected from 199 CTD patients who were admitted to Nanjing Children's Hospital, Jiangsu Province, including 145 TOF, 37 DORV and 17 TGA. Sequencing was used to detect exon mutations and MLPA was used to detect copy number variants of FOG2 gene in CTD patients. **Results** 4 missense mutations were identified in 6 patients with conotruncal heart defect. p. V339I and p. A426T were identified in 2 patients with DORV, p. M703L was identified in 3 patients with TOF and p. T843 was identified in 1 patients with TOF. MLPA signals were all found within the normal range values for all exons in all patients. **Conclusions** FOG2 gene mutations are also common in CTD patients and major contribution of FOG2 gene CNVs was excluded in TOF pathogenesis. But more studies with larger samples are still needed to enhance our understanding of the role of FOG2 gene.

【Key words】 conotruncal heart defect; FOG2 gene; mutation; copy number variant

圆锥动脉干发育畸形(conotruncal heart defect, CTD)是一种先天性心脏病(congenital heart disease, CHD),在新生儿的发生率为 1/1000^[1]。CTD 主要包括法洛四联症(tetralogy of Fallot,

TOF),大动脉错位(transposition of great artery, TGA)和右心室双出口(double-outlet ventricle outflow, DORV)。圆锥动脉干发育畸形属于先天性心脏病的一种复杂类型,一经诊断,需要对患者进行手术修复治疗。虽然大多数圆锥动脉干发育畸形的

* 通讯作者:易龙,E-mail: 18751851015@163.com

病因至今依然不清楚,但是有不少研究表明,遗传因素在CTD的发病过程中起着非常重要的作用。实际上,大约12%的CTD被认为是由22q11微缺失引起的^[2-7]。

FOG2基因编码一张锌指蛋白,包含1151个氨基酸和8个锌指结构域。FOG2蛋白为一种转录辅因子,与下游蛋白GATA4结合形成复合物,在心脏的发育过程中起着至关重要的作用^[8]。FOG2基因敲除小鼠表现出异常的心脏发育,其中包括CTD^[9]。GATA4基因突变的小鼠影响了GATA与FOG2蛋白的结合,从而表现出与FOG2基因敲除小鼠相似的表型^[10]。Pizzuti等^[11]首次在47例TOF病人中发现了FOG2基因的两个错义突变,但对突变的功能研究显示并不影响GATA4与FOG2蛋白的结合,而且FOG2蛋白的表达几乎没有变化。随后的两个研究在CTD病人中又发现了一些突变,主要存在于DORV的病人中,但他们都没有进一步的对FOG2基因突变的致病机制进行研究^[12,13]。而在这些研究选用的人群,主要是欧美人群,而在中国人群,甚至亚洲人群中,FOG2基因在CTD病人中的突变情况,目前还没有报道。

另一方面,拷贝数量变化(copy number variation, CNV),是由于基因组重排导致的主要结构变异类型,包括亚显微结构下大于1kb基因片段的缺失和重复。CNV被认为是影响人类疾病的主要遗传因素之一,突变频率比单核苷酸多态性(SNP)高的多。CNV证实与孟德尔遗传疾病、散发性疾病和复杂疾病的易感性有关,通过改变相关基因的剂量产生临床表型。各种机制参与CNV的形成,主要分为两大类:以DNA重组为基础和DNA复制为基础^[14]。Steven等^[15]对114例TOF病人进行全基因组扫描,结果发现了有11个位点存在拷贝数量变化,因此,不能排除在TOF病人中存在着FOG2基因的拷贝数量变化。

1 材料与方法

1.1 基本资料 从2004年1月至2006年1月,在南京市儿童医院收集了199例CTD的病人,包括145例TOF,37例DORV,17例TGA。CTD的诊

断是以超声心动图为标准,并在手术中得以证实,而且排除了带有其他心脏畸形的病人。在鼓楼体检中心收集100例健康人的血样,这些病人没有先天性心脏病的病史并且超声心动图检查没有心脏结构的异常。所有的CTD病人和正常人都利用Qiagen试剂盒提取出外周血样中的DNA。

1.2 DNA测序和生物信息学分析 人类FOG2基因位于8q23.1,包含8个外显子。8个外显子以及剪接区域利用PCR进行扩增,利用Primer 3.0软件设计FOG2基因的14对特异性引物,其中7对对应FOG2基因的8号外显子。PCR扩增产物利用Gel Extraction Kit (Omega)进行纯化, BigDye Terminator v3.1 Kit进行循环测序,并且利用ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)进行分析。

FOG2基因突变位点的确定从GenBank获取(登录号:NC_000008.10),并利用美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)人类SNP数据库(human SNP database, dbSNP)、千人基因组项目数据库(1000 Genome Project database)以及外显子测序项目(Exome Sequencing Project, ESP)确认新发现的突变。其他物种的FOG2蛋白序列是从NCBI GenBank中获取的,保守性分析利用Clustalw2软件进行分析。突变对基因结构和功能的影响利用PolyPhen-2进行预测。

1.3 多重链接探针扩增(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA) FOG2基因的外显子探针是用H-MAPD(Human MLPA Probe Design)软件进行设计的。MLPA的步骤为:双链DNA分离:100 ng DNA 95℃孵育5 min;杂交:分离后的DNA与探针混合,60℃孵育16~18小时;连接:加入连接酶,54℃孵育15 min;扩增:PCR(35 cycle, 95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 60 s, 72℃ 20 min)。MLPA的产物在ABI 3100 Genetic Analyzer进行分离,利用Gene Mapper软件(Applied Biosystem)进行分析。

2 结果

在6个CTD病人发现了4种错义突变,其中分

别在 2 个 DORV 病人中发现了 p. V339I、p. A426T, 3 个 TOF 病人中发现了 p. M703L, 1 个 TOF 病人中发现了 p. T843M, 总的比例为 3.0% (图 1)。对照组中 100 个正常人中没有发现以上的突变。其中, p. V339I、p. M703L 已经在先前的报道中被发现, p. A426T、p. T843M 是我们研究首次在 CTD 病人中报道的突变。p. A426T、p. M703L、p. V339I 能在 dbSNP 和千人基因组数据库中找到 (rsID: rs35843564、rs121908603、rs201845067), p. A426T 和 p. V339I 能在 ESP 数据库中找到, 但 p. T843M 没有在任何数据库中找到, 是一个新的突变。另外, 我们发现的这 4 种突变, 在其他物种中也是高度保守的(图 2)。利用 PolyPhen2 对这 4 个突变对蛋白功能和结构的影响进行预测, p. V339I 和 p. A426T 被预测为良性突变, 而 p. M703L 和 p. T843M

则被预测为可能引起疾病的突变, 见表 1。

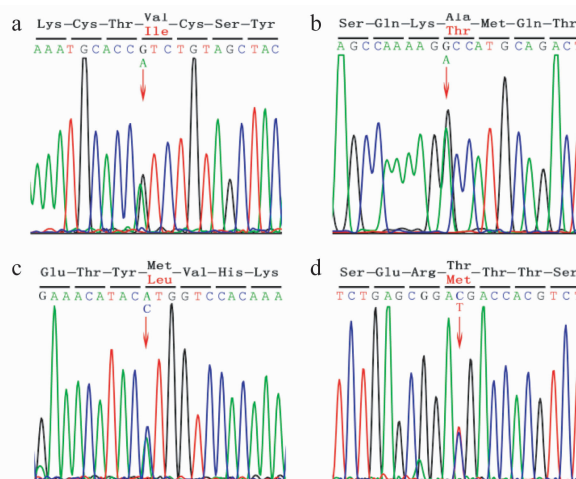


图 1 所发现的 4 种错义突变, (a) ~ (d): V339I, A426T, M703L, T843M

表 1 所发现的 4 种错义突变以及它们的特点

核苷酸改变	氨基酸改变	CTD 类型, 病人人数	报道情况	蛋白位置	Polyphen 预测	遗传情况
c. G1015A	p. V339I	DORV1/DORV1	此研究/曾经报道	锌指结构域 1	良性	未获得/原发的
c. G1276A	p. A426T	DORV1	此研究	不清楚	良性	未获得
c. A2107C	p. M703L	TOF3/TOF1	此研究/曾经报道	锌指结构域 6	可能致病	未获得/原发的
c. C2528T	p. T843M	TOF1	此研究	不清楚	很可能致病	未获得

注: TOF, tetralogy of Fallot, 法洛四联症; DORV, double-outlet ventricle outflow, 右心室双流出道; CTD, conotruncal defects, 圆锥动脉干发育畸形。

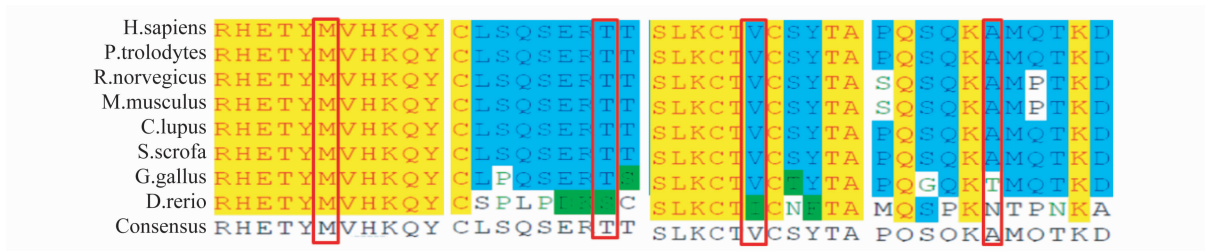


图 2 不同物种间的保守序列分析, 方框中表示突变的位点, 从左到右为 M703L, T843M, V339I 和 A426T

在 145 例 TOF 病人的 MLPA 检测中, 所有的外显子中都检测到正常范围的 MLPA 信号, 这一结果排除了拷贝数量变化在 FOG2 基因引起 CTD 发病机制中的作用, 见图 3。

3 讨论

1999 年, Svensson 等^[8] 研究发现小鼠 FOG2 蛋白能在体内和体外与 GATA4 的 N 端锌指特异性相结合。通过特异性结合, FOG2 能调节 GATA4

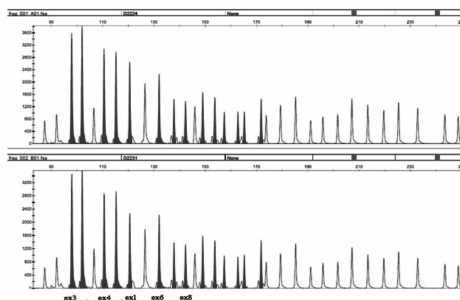


图 3 MLPA 探针的电泳效果图, FOG2 基因所有的外显子都在相应的波峰下标出

的转录活性,因为在小鼠胚胎成纤维细胞和大鼠的心肌细胞中,FOG2基因的过表达能抑制Gata4依赖性的转录过程。2000年,该研究组运用基因定位突变的方法来探究FOG2基因在正常心脏发生中的功能。研究显示FOG2基因缺陷的小鼠在胚胎期的第13天因为充血性心力衰竭而死亡,表现为一种三尖瓣闭锁综合征,包括三尖瓣的缺失、严重的房间隔缺损、室间隔缺损、左心室流出道的延长、主动脉瓣向右移位和肺动脉狭窄。这些FOG2基因缺陷的小鼠在发育中同时也存在着左心室发育不全。该研究展示了FOG2在正常心脏的瓣膜发育中的重要作用以及提示了三尖瓣闭锁综合征的遗传学基础。

2000年,Tevosian等^[9]通过敲除小鼠的FOG2基因来获得Fog2^{-/-}小鼠,敲基因小鼠在胚胎形成的中期死亡,表现出严重的心血管畸形,包括共同房室通道、心室肌发育不良、冠状动脉缺失和法洛四联征。另外,在Fog2^{-/-}小鼠的心脏中,冠状动脉发生非常明显的缺失。而使FOG2在心肌细胞中重新表达能修复Fog2^{-/-}小鼠的血管表型,进一步展示了Fog2基因在心肌中的作用以及在冠状动脉的发育中至关重要。

2001年,Crispino等^[10]建立了使Gata4蛋白单个氨基酸被取代的小鼠模型,削弱其与FOG2蛋白的相互作用。这些小鼠在胚胎期的第12天死亡,表型与Fog2^{-/-}小鼠相似,除了GATA4突变小鼠还存在半月瓣的畸形和双右室流出道。此项研究提示Gata4的功能依赖于FOG2蛋白和另一种心脏特异性FOG蛋白间的相互作用。

FOG2基因突变大多是外显子的错义突变、同义突变、移码突变,以及5'UTR区的变异、非编码的外显子的变异、内含子剪接异常、外显子无义突变成额外的终止密码子和起始密码子,造成蛋白的截短或延长等。它的单个或多个基因的突变或异常表达均会导致心血管发育异常,影响心脏畸形的发生。

2003年,Pizzuti等^[11]对47个TOF患者的FOG2基因进行测序,在其中2个患者中发现了各发现了1个突变(S657G、E30G)。2011,De Luca

等^[12]在1个散发的双右室流出道的病人中,同样发现了FOG2基因上E30G这一突变。2005年,Ackerman等^[16]在30个死亡的膈肌有缺陷的儿童中,在4号外显子上发现了一个突变(R112X),尸体解剖显示患者具有肺发育不良和先天性膈疝。该研究提示FOG2基因这个突变可能会引起原发性的肺部和膈肌缺陷。2007年,Bleyl等^[17]在96个先天性膈疝的病人中发现了FOG2基因7号外显子上的2个突变(M703L和T843A)。2012年,Tan等^[13]在一个双右室流出道患者中发现了同样的突变(M703L)。2011年,De Luca等^[12]在1个散发的双右室流出道的病人中发现了FOG2基因6号外显子的一个突变(I227M),另外,在1个散发的TOF病人中,在FOG2基因8号外显子上发现了另外一个突变(M544I)。2012年,Tan等^[13]在1个双右室流出道合并室间隔缺损的新生儿中,发现了FOG2基因8号外显子上的一个突变(K737E)。

到目前为止,国内外主要报道了13种导致先天性心脏病的FOG2基因突变,其中大多数都发生在多个不相干的家族。FOG2基因突变在CTD病人中所占的比例大约为4%,与我们的结果相似(3%)。

另一方面,虽然FOG2基因的拷贝数量变化在我们的研究中没有发现,但拷贝数量变化作为一种重要的疾病发展发生机制,其对于圆锥动脉干发育畸形这种发生发展机制尚未明确的先天性疾病,仍可能存在相当重要的作用,特别是Alu序列丰富的基因区域,目前与圆锥动脉发育畸形相关的主要基因主要有GATA4,JAG-1,FOG2,GATA6,TBX-1等,这些基因对于拷贝数量变化的检测目前国际上还是相当缺乏,而我们的检测中没有得到阳性结果的原因,除了可能FOG2基因拷贝数量变化不是发生CTD的机制外,还可能由于样本数量太少,检测技术灵敏度和特异性不够强,所选择的区域中没有拷贝数量变化等。因此,依然需要更大样本,更多中心的研究来加强我们对圆锥动脉干发育畸形拷贝数量变化情况的认识。

2011年,Tan等^[13]通过对FOG2基因与TOF发生的特异性和敏感度分析显示,虽然其灵敏度不

高,但有较高的特异性,据此可以为 FOG2 基因在 TOF 的产前诊断和基因治疗提供依据。FOG2 基因是心脏发育过程中较早表达的转录因子,与 GATA4 相互作用贯穿心脏发育的全过程,在心脏的发育中发挥重要的作用。该基因发生变异将可能导致先天性膈疝、法洛四联症(TOF)或双右室流出道(DORV),对于妊娠期的妇女,特别是带有明显家族史的妇女,通过抽取产前绒毛组织或羊水,进行 FOG2 基因筛查,结合胎儿超声心动图的检查,早发现心脏发育异常的胎儿,争取早期治疗和终止妊娠的机会,减轻家庭负担和社会负担。

参 考 文 献

- [1] Ferencz C, Rubin JD, McCarter RJ, et al. Congenital heart disease: prevalence at livebirth the baltimore-washington infant study[J]. *American Journal of Epidemiology*, 1985, 121(1): 31-36.
- [2] Goldmuntz E, Clark BJ, Mitchell LE, et al. Frequency of 22q11 deletions in patients with conotruncal defects[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 1998, 32(2): 492-498.
- [3] Cuneo BF, Langman CB, Ilbawi MN, et al. Latent hypoparathyroidism in children with conotruncal cardiac defects[J]. *Circulation*, 1996, 93(9):1702-1708.
- [4] Webber SA, Hatchwell E, Barber JC, et al. Importance of microdeletions of chromosomal region 22q11 as a cause of selected malformations of the ventricular outflow tracts and aortic arch: a three-year prospective study[J]. *The Journal of Pediatrics*, 1996, 129(1):26-32.
- [5] Takahashi K, Kido S, Hoshino K, et al. Frequency of a 22q11 deletion in patients with conotruncal cardiac malformations: a prospective study[J]. *European Journal of Pediatrics*, 1995, 154(11):878-881.
- [6] Amati F, Mari A, Digilio MC, et al. 22q11 deletions in isolated and syndromic patients with tetralogy of Fallot[J]. *Human Genetics*, 1995, 95(5):479-482.
- [7] Goldmuntz E, Driscoll D, Budarf ML, et al. Microdeletions of chromosomal region 22q11 in patients with congenital conotruncal cardiac defects[J]. *Journal of Medical Genetics*, 1993, 30(10): 807-812.
- [8] Svensson EC, Tufts RL, Polk C E, et al. Molecular cloning of FOG-2: a modulator of transcription factor GATA-4 in cardiomyocytes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96(3): 956-961.
- [9] Tevosian SG, Deconinck AE, Tanaka M, et al. FOG-2, a cofactor for GATA transcription factors, is essential for heart morphogenesis and development of coronary vessels from epicardium[J]. *Cell*, 2000, 101(7):729-739.
- [10] Crispino JD, Lodish MB, Thurberg BL, et al. Proper coronary vascular development and heart morphogenesis depend on interaction of GATA-4 with FOG cofactors[J]. *Genes & Development*, 2001, 15, (7):839-844.
- [11] Pizzuti A, Sarkozy A, Newton AL, et al. Mutations of ZFPM2/FOG2 gene in sporadic cases of tetralogy of Fallot[J]. *Human Mutation*, 2003, 22(5):372-377.
- [12] De Luca A, Sarkozy A, Ferese R, et al. New mutations in ZFPM2/FOG2 gene in tetralogy of Fallot and double outlet right ventricle[J]. *Clinical Genetics*, 2011, 80(2):184-190.
- [13] Tan ZP, Huang C, Xu ZB, et al. Novel ZFPM2/FOG2 variants in patients with double outlet right ventricle[J]. *Clinical Genetics*, 2012, 82(5): 466-471.
- [14] Zhang F, Gu W, Hurles ME, et al. Copy number variation in human health, disease, and evolution[J]. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2009, 10:451-481.
- [15] Greenway SC, Pereira AC, Lin JC, et al. De novo copy number variants identify new genes and loci in isolated sporadic tetralogy of Fallot[J]. *Nature Genetics*, 2009, 41(8):931-935.
- [16] Ackerman KG, Herron BJ, Vargas SO, et al. Fog2 is required for normal diaphragm and lung development in mice and humans[J]. *Plos Genetics*, 2005, 1(1):58-65.
- [17] Bleyl SB, Moshrefi A, Shaw GM, et al. Candidate genes for congenital diaphragmatic hernia from animal models: sequencing of FOG2 and PDGFR alpha reveals rare variants in diaphragmatic hernia patients[J]. *European Journal of Human Genetics*, 2007, 15(9): 950-958.

编辑:熊诗诣

(收稿日期:2014-02-21)