

一个马凡综合征家系 FBN1 基因新变异及遗传学分析

张丁丁¹, 冯潇颖², 蒋媛媛¹

1. 四川省医学科学院·四川省人民医院(电子科技大学医学院), 四川 成都 610072; 2. 成都中医药大学医学院, 四川 成都 610072

【摘要】目的 对 1 个马凡氏综合征(MFS)家系的 FBN1 基因进行变异筛查分析,探讨 MFS 患者的遗传学特征。**方法** 选择在四川省人民医院就诊的 1 例疑似 MFS 的女性患者及其家庭成员为研究对象,对患者及其家庭成员外周血进行基因组 DNA 的提取,行全外显子组测序(WES),应用 Sanger 测序技术对初步识别的可能致病变异位点进行验证。运用生物信息学软件对蛋白质的结构及功能进行预测。**结果** 经 Sanger 测序验证,在先证者及其儿子的 FBN1 基因第 63 外显子上均存在 c. 7719dupT(p. Asn2574*) 杂合突变。经检索数据库该变异为新变异。生物信息学分析提示该变异可能致病。不同物种的 FBN1 氨基酸序列保守性分析显示相对保守。该变异可能改变 FBN1 蛋白原有的二级结构和氨基酸的疏水性特性。**结论** FBN1 基因 c. 7719dupT(p. Asn2574*) 新变异可能为患者的致病原因,进一步拓展了 MFS 患者的基因变异谱。

【关键词】 马凡综合征; FBN1 基因; 突变; 生物信息学分析

【中图分类号】 R394

【文献标志码】 A

【文章编号】 1672-6170(2024)06-0054-05

A new mutation and genetic analysis of FBN1 gene in a Marfan syndrome family ZHANG Ding-ding¹, FENG Xiao-ying², JIANG Yuan-yuan¹ 1. Sichuan Academy of Medical Sciences · Sichuan Provincial People's Hospital (Medical School of University of Electronic Science and Technology of China), Chengdu 610072, China; 2. College of Medical Technology, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China

【Abstract】Objective To conduct the screening analysis of a mutation of the FBN1 gene in a Marfan syndrome (MFS) family and to explore the genetic characteristics of MFS patients. **Methods** A female patient with suspected MFS and her family members treated in our hospital were selected as study subjects. Peripheral venous blood samples were collected from the patients and her family members to extract genomic DNA. Whole exome sequencing (WES) was conducted. Sanger sequencing was applied to validate the variant loci of the suspected causative genes. Structure and function prediction of protein were performed by bioinformatics software. **Results** Sanger sequencing revealed a c. 7719dupT (p. Asn2574*) heterozygous mutation in the FBN1 gene at exon 63 were identified in the patient and her son. The mutation was found to be a new mutation after searching the database. It was predicted that the variation had potential pathogenicity through bioinformatics analysis. Multiple sequence alignment revealed that the mutation took place in a relatively conserved region among different species. This mutation site could lead to alterations in the secondary structure of the FBN1 protein and its amino acid hydrophobicity. **Conclusions** The mutation c. 7719dupT (p. Asn2574*) in the FBN1 gene may be the pathogenic cause for the MFS patient. The findings further broaden the spectrum of genetic mutations associated with MFS.

【Key words】 Marfan syndrome; FBN1 gene; Mutations; Bioinformatics analysis

马凡综合征(marfan syndrome, MFS)是一种易累及心血管、眼、骨骼等多系统遗传性结缔组织疾病,该病也可影响到中枢神经系统、呼吸系统和皮肤组织等^[1]。患病率约为 1/5000 ~ 1/3000^[2, 3]。MFS 患者的临床表现以晶状体异位、近视、视网膜脱落、胸主动脉瘤、二尖瓣脱垂、体型瘦长、脊柱侧凸、蜘蛛指等为主要特征^[4]。该疾病易影响心血管系统,主动脉根部破裂是 MFS 患者出现死亡的主要原因^[5]。

迄今 MFS 的发病机理尚待阐明,遗传因素在该病的发展中可能扮演着重要角色。研究显示,该病以常染色体显性遗传为主要方式, FBN1、TGFB1、TGFB2 和 LTBP2 都与 MFS 患者的发病有关^[6]。其中 FBN1 基因与 MFS 的发病密切相关,已被纳入 MFS 的诊断标准^[7]。MFS 表现出高度的家族间和

家族内变异性,该病的同一家系成员之间在病情严重程度上可出现较大差别,如仅以临床表型来进行评估,可能使患者失去早期诊治的良好阶段,因此,该病的早期诊断至关重要。本研究中,我们采用 WES 和 Sanger 测序对一个临床表现疑似 MFS 患者的突变位点进行筛查和验证,以明确其遗传学病因,探讨了该突变导致的相关蛋白结构功能的变化。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2024 年 1 月该家系病例来自四川省人民医院眼科门诊(图 1)。先证者,女,54 岁,因“视物模糊”前来就诊,眼科门诊初步诊断为左眼晶状体半脱位,查体发现患者有“蜘蛛指”(图 2),超声心动图结果未见异常。该先证者的儿子有眼睛近视、脊柱侧凸、鸡胸表现,临床表现疑似 MFS 患者。在本研究中,遵循《赫尔辛基宣言》伦理准则,患者及家系成员知情同意,获批院伦理委员会的审查(伦审 2024657)。

【基金项目】四川省科技计划重点研发项目资助(编号:2023YFS0311);成都市医学科研课题(编号:2024025)

1.2 方法

1.2.1 标本采集 患者及家系成员外周血 EDTA 抗凝,提取外周血基因组 DNA。运用 Nanodrop 2000 紫外分光光度计行基因组 DNA 浓度和纯度的测定。将制备好的 DNA 溶液保存在 -80 °C 冰箱。

1.2.2 全外显子组测序 基因组 DNA 样本,送艾吉康(嘉兴)生物科技有限公司进行全外显子组测序(WES)。使用酶切或超声将基因组 DNA 打碎成 150-250 bp 的片段,利用液相捕获技术行特异富集后,在 Novaseq 6000、Nextseq 500、DNBSEQ-T7、MGISEQ-2000 等二代测序平台上进行高通量、高深度测序。对测序数据,通过软件 Burrows-Wheeler-Aligner (BWA),结合人类参考基因组 (GRCh37/hg19 或 GRCh38/hg38) 比对,运用 samtools、GATK 等软件对 SNVs 和 InDel 进行检测,通过 ANNOVAR 软件对变异位点进行翻译和注释。采用 SIFT 和 PolyPhen-2 软件分析突变的有害性,对相应变异的致病性评估依照美国遗传学与基因组学 (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) 学会标准。

1.2.3 Sanger 测序验证 运用 Primer Premier5 对筛选到的变异位点进行引物设计。在 NCBI 数据库中查找 FBNI 序列,并在 UCSC 数据库 (<https://genome.ucsc.edu/>) 中验证 PCR 引物的特异性。引物:正向引物序列 F: ATGCCTTTCCTAAGTATATCAAGACT,反向引物序列 R: CTCATAGGACCTGATAGCCAT。进行 Sanger 测序,比对分析测序结果。

1.2.4 生物学信息分析 对筛选出的可能致病突变位点进行生物学信息分析。使用 TB-tools 分析保守结构域的序列和结构特征,使用 T-Coffee 软件进行氨基酸序列的保守性分析。应用 Raptor, Pymol 软件对 FBNI 蛋白上的变异位点进行蛋白结构三维模型预测,并进一步采用 ProtScale 软件分析蛋白质的疏水性改变。

2 结果

2.1 全外显子组测序分析 通过高通量测序技术实现对基因组区域的广泛覆盖,平均测序深度 166.42X,超过 99.67% 的目标序列得到了充分的检测。经筛选处理,从原始数据集中获得 3009 个变异。经筛选发现患者 FBNI 基因第 63 外显子的一处杂合变异 (c. 7719dupT; p. Asn2574 *)。该突变使第 7719 位胸腺嘧啶重复出现,形成无义突变,编码的氨基酸第 2574 密码子由天冬酰胺变为终止密码子,导致蛋白质翻译提前终止。

2.2 Sanger 测序结果及致病性分析 变异点呈现双峰,突变位点为杂合突变。先证者 (II-1) 和其儿子 (III-1) 存在相同的无义突变 (c. 7719dupT; p. Asn2574 *)。由于先证者母亲已故,未能采集到其母亲的血样,暂无法判断该变异的来源。而该家系中的其余成员 (I-2、II-2、II-3) 的外周血样,经检测在该位点上未见变异 (图 3)。通过 NCBI-ClinVar 数据库及人类基因突变 (HGMD) 数据库检索,未见该突变位点的报道。根据 ACMG 发布的遗传变异分类标准,该变异的证据为 PVS1+PM2,判断为可能致病性突变。

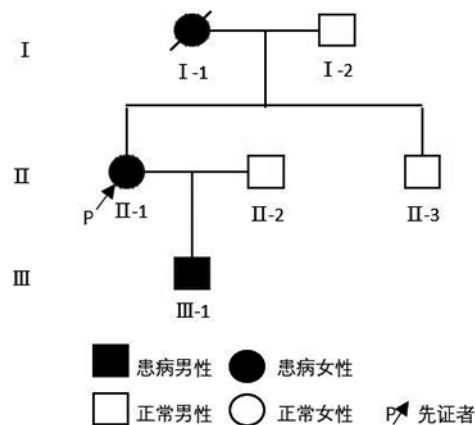


图 1 MFS 患者的家系图

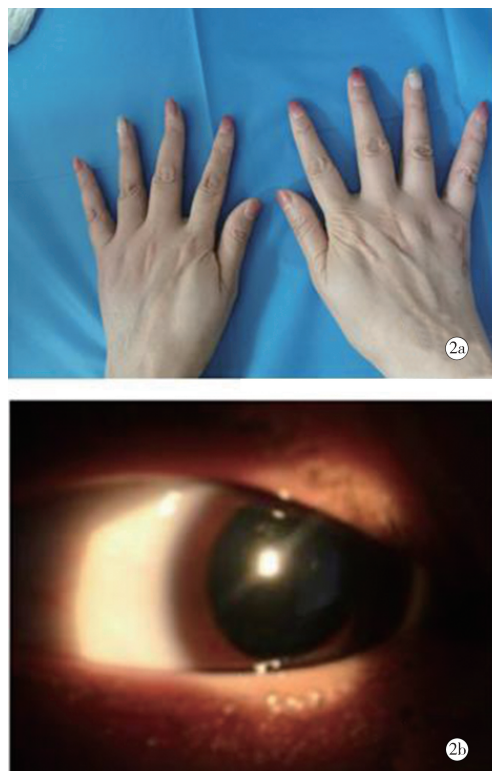


图 2 MFS 患者的临床资料 a:蜘蛛指;b:晶状体异位

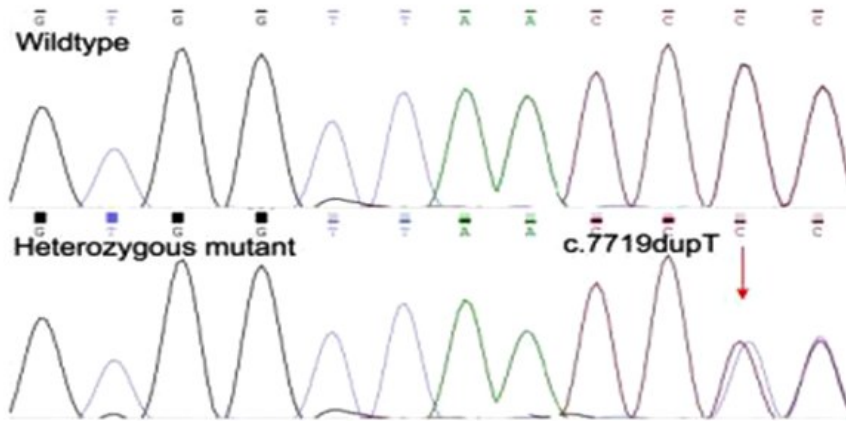


图3 MFS患者与野生型的Sanger测序图 红色箭头示相应的测序峰

2.3 蛋白质结构和功能预测 保守结构域的序列和结构特征显示该变异发生在 cbEGF 结构域(图4)。突变区域蛋白质在不同物种的 FBNI 蛋白序列中相对保守(图5)。突变后蛋白质疏水作用减弱,

亲水性增加(图6)。此外,突变蛋白3D结构预测显示变异后蛋白质部分缺失,翻译在天冬氨酸后停止,导致连接天冬氨酸的氢键和半胱氨酸一并缺失(图7)。

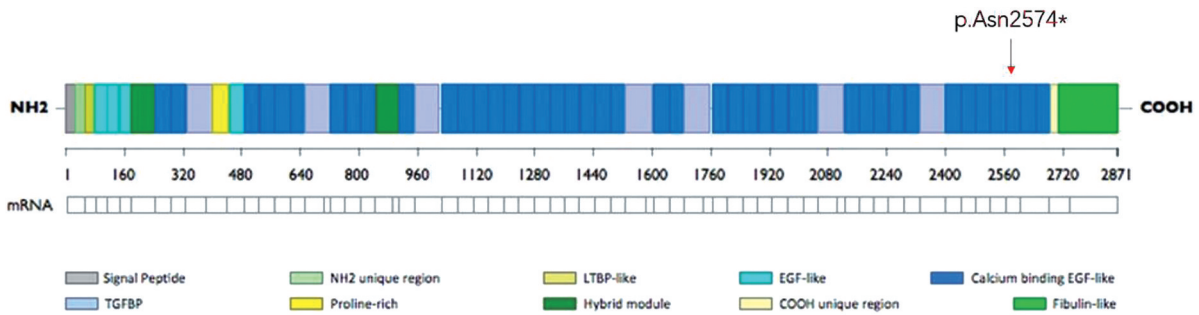


图4 FBNI 蛋白的功能结构域 红色箭头指向 p. Asn2574 * 突变发生 cbEGF 区域

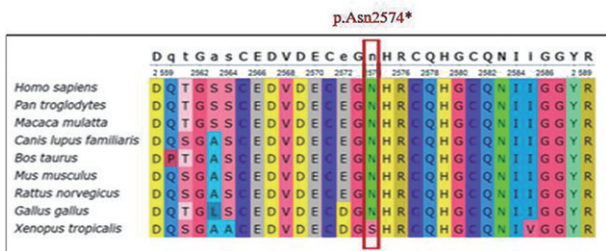


图5 不同物种 FBNI 氨基酸序列保守性分析 突变区域的天冬氨酸(红色方框)在 FBNI 蛋白中相对保守

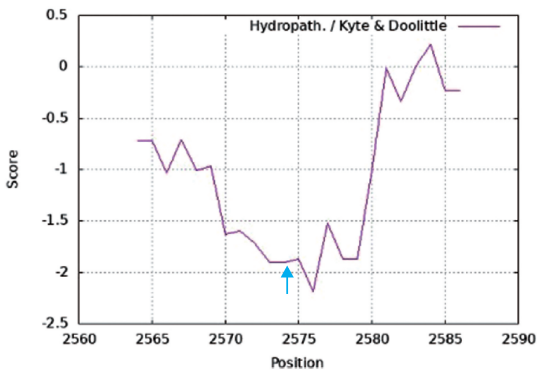


图6 FBNI 蛋白质疏水性分析 蓝色箭头所指为突变位点

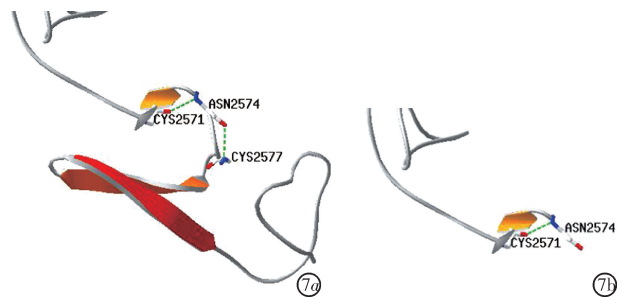


图7 蛋白质结构预测 a:野生型 FBNI 蛋白末端三维结构;b:突变型(p. Asn2574 *) FBNI 蛋白末端的三维结构;绿色虚线表示氢键

3 讨论

MFS 是一种严重影响患者生存质量的遗传性结缔组织病。MFS 发病常无种族与性别差异,受到基因组印记、表观遗传修饰等影响^[8]。根据临床症状不同可将 MFS 分为经典型和不完全型。经典 MFS 的诊断通常基于三主征的存在,即骨骼、眼、心血管改变三大系统的典型表现和家族史。不完全 MFS 的诊断则是基于两项或一项典型改变,且可能没有家族史或遗传史。本例患者表现为晶状体异

位和蜘蛛指,有 MFS 家族史,经基因检测提示有 FBNI 基因变异,临床表现温和,为不完全 MFS。

研究显示,约 90% MFS 患者的发病由 FBNI 基因突变引起,少部分患者的发病与 TGFBR1 基因或 TGFBR2 基因突变有关^[8]。FBNI 基因位于 15q21.1,含 65 个外显子。所编码的 FBNI 蛋白系 350 kDa 的弹性蛋白相关糖蛋白,由成纤维细胞产生,常作为细胞外基质中微纤维的主要成分^[9]。FBNI 蛋白以不溶性微纤维的形式掺入细胞基质中,作为弹性蛋白沉积的支架使结缔组织富有弹性,在心血管、骨骼、眼等组织表达,对维持弹性纤维稳定中起着重要作用^[1, 10]。FBNI 基因自 1991 年被发现以来,已有 3077 种变异。FBNI 基因突变在几乎所有外显子中都可见到,其中大部分是受影响的患者或家庭所特有的。FBNI 基因突变有错义突变、无义突变、拷贝数变异、缺失突变或微小插入与其他结构变异等类型。点突变是较常见的突变类型,有 60% 的错义突变和 10% 的无义突变^[11]。其突变可导致细胞外基质形态改变,进而影响到弹性纤维的稳定及完整性,最终导致相应组织器官的病理改变^[12]。

FBNI 分子中含有多种蛋白质结构域:表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)蛋白结构域 47 个、高度保守的钙结合区域(cbEGF)43 个、转化生长因子(TGF- β binding protein like domain)结构域 7 个^[9]。其中 cbEGF 样结构域是 FBNI 最常见的结构域,大约 60% 的 FBNI 错义突变发生在 cbEGF 样结构域^[13]。cbEGF 结构域通常包含一个或多个钙离子结合位点,这些位点有助于稳定蛋白质的三维结构^[14, 15]。此外,cbEGF 区域的氨基酸序列高度保守,在该区域发生的基因变异可能会给氨基酸序列带来一定的影响。FBNI 基因的表达对于维持心脏瓣膜、眼睛、皮肤和骨骼等组织的健康状态尤为重要。本例 MFS 患者突变发生在 cbEGF 结构域,FBNI 携带 c. 7719dupT (p. Asn2574 *) 无义突变。FBNI 蛋白翻译在天冬氨酸后停止,导致天冬氨酸下游的氢键和半胱氨酸缺失,推测这些突变可能带来截断后蛋白在空间构象上的变化,其部分截断对该病的发病影响尚待进一步阐明。

MFS 的诊断标准包括不同器官系统的主要和次要表现,其主要临床表现为晶状体异位和主动脉根部动脉瘤/夹层^[16]。MFS 引起的心脏和血管问题更危险,而 MFS 的眼部表现常见且多样,包括晶状体异位、高度近视、视网膜脱落等^[17]。本例患者因视物模糊前来就诊,诊断左眼晶状体异位(EL)。人的晶状体由带状晶丝保持在虹膜后面的自然位置,一起在赤道晶状体和睫状体之间形成环状结构^[18]。

原纤维蛋白是带状晶丝的主要大分子成分,其中丰富的原纤维蛋白 1 由 FBNI 编码。FBNI 基因突变可能导致原纤维蛋白 1 的结构和功能障碍,晶状体无法保持在正常位置,导致脱位^[19]。

研究表明,FBNI 基因变异的位置与表型有一定关系^[14, 15]。不同的突变位点可能导致不同程度的蛋白质功能损失,产生不同表型。如外显子 24 ~ 32 区域的突变,与新生儿 MFS 和严重主动脉表型相关^[20]。本例患者 FBNI 基因的突变位于第 63 外显子,表现为晶状体异位和蜘蛛指,心血管系统未见明显病变。此前有研究认为 FBNI 外显子 59-65 其中大部分突变与轻度表型相关,其特征是缺乏显著的主动脉病理改变^[21]。Palz 等通过温度梯度凝胶电泳对 124 例 MFS 患者和 5 例 MFS 样患者的外显子进行分析,发现约 7% 的突变(9/124)与较温和的表型相关^[22]。Turner 等分析了 113 例 MFS 或 MFS 样患者,在发现的 53 个变异中,6 个突变发生在该区域^[23]。根据临床特征,这些患者中只有 1 人符合根特标准。Palz 和 Turner 的研究结果与本例患者的症状相符。然而也有报道显示该区域的突变伴随严重的心血管病变。Potter 等在一个家系中发现了 FBNI 第 59 外显子 c. 7409G>A (p. Cys2470Tyr) 错义突^[24]。携带该变异的患者均表现为主动脉根部扩张。Attanasio 等在 10 例外显子 59-65 突变的患者中,发现除 1 例外,其余均为典型的 MFS,严重累及心血管系统^[25]。即并非所有位于外显子 59-65 的突变都与轻度表型相关。该区域发生的突变总数相对较少,突变密度低于中心区域。迄今为止在轻度马凡样表型患者中发现的该区域突变数量仍然很少,且报道文献可能偏向于严重病例^[9]。此外,MFS 表型通常随着时间的推移而发展,一些由于缺乏主动脉根部扩张而被归结为“轻度”表型的患者,随着病程的进展,可能会逐渐出现主动脉扩张等心血管系统表现,但在疾病的早期或因症状不典型,往往不易诊断。因而,探讨 MFS 患者基因型和表型间的关系,为深入研究 MFS 患者发病的分子机制提供思路。

马凡综合征迄今尚无治愈的方法,基因检测是该病确诊的重要环节,特别是在临床表现不典型或家族史不明确的情况下^[26]。在一个 MFS 家系中,我们发现了一个新的 FBNI 基因突变,这在之前未被报道过。该研究丰富了 MFS 的变异谱,加深对 FBNI 突变的基因型与表型间关系的认识,有助于为 MFS 患者及家系成员的遗传咨询提供帮助。

【参考文献】

[1] Zeigler SM, Sloan B, Jones JA. Pathophysiology and pathogenesis of

- Marfan syndrome [J]. *Advances in experimental medicine and biology*, 2021, 1348: 185-206.
- [2] Marelli S, Micaglio E, Taurino J, et al. Marfan syndrome: enhanced diagnostic tools and follow-up management strategies [J]. *Diagnostics (Basel)*, 2023, 13(13): 2284.
- [3] Pollock L, Ridout A, Teh J, et al. The musculoskeletal manifestations of Marfan syndrome: diagnosis, impact, and management [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2021, 23(11): 81.
- [4] Milewicz DM, Braverman AC, De Backer J, et al. Marfan syndrome [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7(1): 64.
- [5] Yang Y, Xie E, Liu Y, et al. Calcium promotes vascular smooth muscle cell phenotypic switching in Marfan syndrome [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2023, 665: 124-132.
- [6] Du Q, Zhang D, Zhuang Y, et al. The molecular genetics of Marfan syndrome [J]. *International Journal of Medical Sciences*, 2021, 18(13): 2752-2766.
- [7] Wang JJ, Yu B, Sun Y, et al. FBN1 splice-altering mutations in Marfan syndrome: a case report and literature review [J]. *Genes*, 2022, 13(10): 1842.
- [8] 杨书婷, 罗芳. 马方综合征的最新诊疗进展 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2022, 24(7): 826-831.
- [9] Sakai LY, Keene DR, Renard M, et al. FBN1: The disease-causing gene for Marfan syndrome and other genetic disorders [J]. *Gene*, 2016, 591(1): 279-291.
- [10] Guo D C, Duan X, Mimmagh K, et al. An FBN1 deep intronic variant is associated with pseudoexon formation and a variable Marfan phenotype in a five generation family [J]. *Clinical Genetics*, 2023, 103(6): 704-708.
- [11] Coelho SG, Almeida AG. Marfan syndrome revisited: From genetics to the clinic [J]. *Rev Port Cardiol (Engl Ed)*, 2020, 39(4): 215-226.
- [12] Lin MR, Chang CM, Ting J, et al. Application of whole exome sequencing and functional annotations to identify genetic variants associated with Marfan syndrome [J]. *J Pers Med*, 2022, 12(2): 198.
- [13] Zhang M, Chen Z, Chen T, et al. Cysteine substitution and calcium-binding mutations in FBN1 cbEGF-Like domains are associated with severe ocular involvement in patients with congenital ectopia lentis [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 816397.
- [14] Haller SJ, Roitberg AE, Dudley AT. Steered molecular dynamic simulations reveal Marfan syndrome mutations disrupt fibrillin-1 cbEGF domain mechanosensitive calcium binding [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 16844.
- [15] Hilhorst-Hofstee Y, Rijlaarsdam ME, Scholte AJ, et al. The clinical spectrum of missense mutations of the first aspartic acid of cbEGF-like domains in fibrillin-1 including a recessive family [J]. *Human Mutation*, 2010, 31(12): E1915-1927.
- [16] Akram H, Aragon-Martin JA, Chandra A. Marfan syndrome and the eye clinic: from diagnosis to management [J]. *Therapeutic Advances in Rare Disease*, 2021, 2: 26330040211055738.
- [17] Chen ZX, Chen TH, Zhang M, et al. Correlation between FBN1 mutations and ocular features with ectopia lentis in the setting of Marfan syndrome and related fibrillinopathies [J]. *Human mutation*, 2021, 42(12): 1637-1647.
- [18] Chen TH, Chen ZX, Zhang M, et al. Combination of panel-based next-generation sequencing and clinical findings in congenital ectopia lentis diagnosed in Chinese patients [J]. *American Journal of Ophthalmology*, 2022, 237: 278-289.
- [19] Chen Z, Chen T, Zhang M, et al. Fibrillin-1 gene mutations in a Chinese cohort with congenital ectopia lentis: spectrum and genotype-phenotype analysis [J]. *The British Journal of Ophthalmology*, 2022, 106(12): 1655-1661.
- [20] Muñio-Mosquera L, Cervi E, De Groote K, et al. Management of aortic disease in children with FBN1-related Marfan syndrome [J/OL]. *European Heart Journal*, 2024, 45(39): 4156-4169.
- [21] Li L, Huang J, Liu Y. The extracellular matrix glycoprotein fibrillin-1 in health and disease [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2023, 11: 1302285.
- [22] Palz M, Tiecek F, Booms P, et al. Clustering of mutations associated with mild Marfan-like phenotypes in the 3' region of FBN1 suggests a potential genotype-phenotype correlation [J]. *American Journal of Medical Genetics*, 2000, 91(3): 212-221.
- [23] Turner CL, Emery H, Collins AL, et al. Detection of 53 FBN1 mutations (41 novel and 12 recurrent) and genotype-phenotype correlations in 113 unrelated probands referred with Marfan syndrome, or a related fibrillinopathy [J]. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 2009, 149(2): 161-170.
- [24] Potter KJ, Creighton S, Armstrong L, et al. The c.7409G>A (p. Cys2470Tyr) Variant of FBN1: phenotypic variability across three generations [J]. *Molecular Syndromology*, 2013, 4(3): 125-135.
- [25] Attanasio M, Lapini I, Evangelisti L, et al. FBN1 mutation screening of patients with Marfan syndrome and related disorders: detection of 46 novel FBN1 mutations [J]. *Clinical Genetics*, 2008, 74(1): 39-46.
- [26] Monda E, Caiazza M, Limongelli G. The role of genetic testing in Marfan syndrome [J]. *Current Opinion in Cardiology*, 2024, 39(3): 162-169.

(收稿日期:2024-06-08;修回日期:2024-09-15)

(本文编辑:侯晓林)