

## 常染色体显性遗传性听神经病家系全外显子组测序分析

吴 亮<sup>1</sup>, 刘婷婷<sup>1</sup>, 魏钦俊<sup>2</sup>, 陈智斌<sup>1</sup>, 鲁雅洁<sup>2</sup>, 邢光前<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院耳鼻咽喉科, 江苏 南京 210029; <sup>2</sup>南京医科大学生物技术系, 江苏 南京 211166)

**[摘要]** 目的: 在多年围绕 1 个常染色体显性遗传性非综合征型听神经病家系开展系统分子遗传学研究的基础上, 进一步探讨该家系耳聋的致病机制, 以期发现新的听神经病致病基因和突变位点。方法: 对 3 例耳聋患者和 1 例配偶进行全外显子组测序, 初步筛选出与家系耳聋相关的候选致病基因。采用 PCR-Sanger 测序法, 检测上述候选基因变异是否与家系表型共分离。最后, 以 50 例与研究家系无关的听力正常人为对照, 检测候选致病突变在正常群体中的突变频率和 SNPs 遗传多态性。结果: 全外显子测序分析得到 41 个候选致病基因突变; 用 PCR-Sanger 测序法对核心家系的 9 名成员和 2 名家系外听力正常人进行验证, 仅发现 1 个基因突变 (ALOX15B 7942797 C>T) 与家系耳聋表型共分离。选取 50 例家系外正常对照的 DNA 样本对 ALOX15B 基因进行 PCR 扩增和序列分析, 结果显示有 2 例听力正常人也检测到该基因的同变异, 提示该变异为 SNPs 遗传多态性。结论: 对核心家系成员的全外显子组测序分析和 Sanger 测序法验证未发现有意义的突变位点, 排除了该家系耳聋由基因编码区突变及 Indels 致病的可能性。

**[关键词]** 听神经病; 全外显子测序; 基因突变; 常染色体显性遗传

**[中图分类号]** Q344.12

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)08-1029-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20170822

## Whole-exome sequencing analysis in a Chinese pedigree with autosomal dominant auditory neuropathy

Wu Liang<sup>1</sup>, Liu Tingting<sup>1</sup>, Wei Qinjun<sup>2</sup>, Chen Zhibin<sup>1</sup>, Lu Yajie<sup>2</sup>, Xing Guangqian<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; <sup>2</sup>Department of Biotechnology, NJMU, Nanjing 211166, China)

**[Abstract]** **Objective:** On the basis of previous systematic investigation on a Chinese pedigree with dominantly inherited auditory neuropathy, we aims to further search the deafness-causing genes (mutations) involved in this family. **Methods:** Whole-exome sequencing was conducted in three affected members and one spouse to determine the candidate genes related to the pedigree, and cosegregation analysis was performed on other members of the family. Finally, fifty normal-hearing individuals acting as controls were recruited for candidate variant detection. **Results:** A total of 41 variations were identified by whole-exome sequencing analysis. These variations were verified in the kernal pedigree members and 2 normal-hearing individuals by PCR-Sanger sequencing. The results showed that there was only ALOX15B gene co-segregated with the phenotype of the family. This gene mutation, however, was also detected in 2 of 50 normal-hearing individuals, which excluded the causative effect of ALOX15B mutation in this family. **Conclusion:** Whole-exome sequencing combined with Sanger sequencing does not reveal novel gene mutation in this family, which excludes the causative effects of Indels or mutations in coding sequence.

**[Key words]** auditory neuropathy; whole-exome sequencing; gene mutation; autosomal dominant inheritance

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(08): 1029-1032, 1050]

听神经病(auditory neuropathy, AN)是一组具有特殊听力学和临床表现的听功能障碍症候群, 多于婴幼儿和青少年期发病, 病因学和临床表现上存在高度的异质性。近年来, 遗传因素在本病病因学中的重要性已引起国内外学者的广泛关注<sup>[1-2]</sup>。迄今已克隆的 AN 致病基因有: DIAPH3 突变导致常染色体显

性遗传非综合征型 AN<sup>[3-4]</sup>, OTOF 突变导致常染色体隐性非综合征型 AN<sup>[5-6]</sup>, AIFM1 突变引起 X-连锁隐性 AN<sup>[7]</sup>, MPZ 基因突变与综合征型 AN 相关<sup>[8]</sup>, 而 DFNBS9 突变可引起隐性遗传的综合征型和非综合征型 AN 2 种不同的表型<sup>[9]</sup>。此外 Wang 等<sup>[10]</sup>在 1 例 AN 患者中检测到线粒体 DNA (mtDNA) 12S rRNA

T1095C 突变。

多年来,本课题组围绕 1 个常染色体显性遗传性非综合征型 AN 家系开展了系统的分子遗传学研究,包括:采用候选基因克隆法先后排除了 mtDNA 12SrRNA、OTOF、MPZ、DFNB59 以及 DIAPH3 等已知基因突变与家系耳聋的相关性<sup>[11-15]</sup>;连锁分析未能找到与疾病连锁的染色体区域。为进一步探讨该家系耳聋的致病机制,本研究拟采用全外显子组测序(whole-exome sequencing, WES)技术,对家系相关成员进行全外显子组序列分析,以期发现新的 AN

致病基因和突变位点。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

家系共 5 代 38 人(图 1)。患者全部集中在 1 个 4 代 11 人的分支家系——核心家系,现存 3 代 9 人(以下描述均针对核心家系)。前期研究已确诊该家系表型为常染色体显性遗传的非综合征型 AN<sup>[11]</sup>。本研究得到南京医科大学伦理委员会的论证认可。

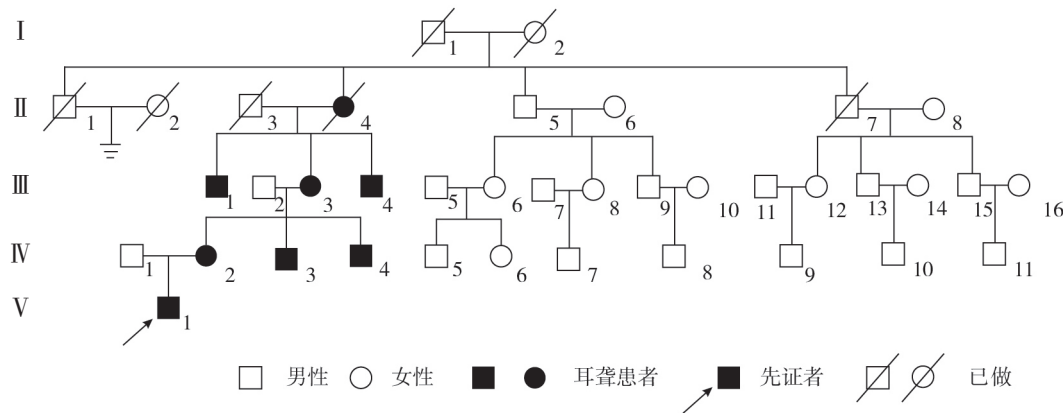


图 1 听神经病家系谱

Figure 1 Family pedigree with auditory neuropathy

## 1.2 方法

### 1.2.1 基因组 DNA 制备

知情同意后,取核心家系成员外周静脉血各 5 mL,EDTA 抗凝。用血液基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取外周血中的 DNA,方法参照试剂盒说明。DNA 经紫外分光光度计进行定量和纯度检测,保存于-20 °C 备用。

共收集核心家系样本 9 例,其中患者 7 例,正常配偶 2 例;另取听力正常人 50 例血样为研究对照。

### 1.2.2 全外显子组测序分析

委托北京华大基因研究中心完成,大致步骤如下。

#### 1.2.2.1 芯片杂交及 Solexa 测序

选择 4 例核心家系成员(3 例患者和 1 例配偶),每人各取 15~20 μg 基因组 DNA 随机打断成 500 bp 左右的片段,在片段两端分别连接上接头,制备杂交文库。文库鉴定合格后的 DNA 片段与 NimbleGen 芯片进行杂交。将经过富集的外显子区域的 DNA 片段洗脱下来,LM-PCR 线性扩增,扩增后的片段经过富集度质控后,进行测序文库制备并上机测序(Illumina HiSeq 2000)。

#### 1.2.2.2 数据处理和生物信息学分析

如上 Solexa 测序得到家系样本的原始数据,在进行包括图像识别、碱基识别、过滤接头序列和检测可能的样本污染等基本数据处理后,进行生物信息学分析。主要包括:将经处理的数据与参考基因组比对,找到单一比对到基因组上的数据序列,将其与外显子组区域再比对;随后,进行目标区域中的单碱基深度分布和覆盖度的均一性分析、SNPs/InDels 的识别和参考已有数据库,注释 SNPs/InDels;在此基础上,结合 DFNA 已发现的耳聋致病基因的信息及突变位点,对该家系成员的对应序列位点进行排查;最后,将变异定位到部分候选基因上。

#### 1.2.3 候选致聋基因的 Sanger 测序

根据以上测序所确定的候选致病基因及突变位点,在 <http://www.ncbi.nih.gov/> 上查询到相应基因序列,应用 Gene Tool 软件对每个候选突变进行引物设计(本研究共设计 40 对引物)。所有引物由北京华大基因科技股份有限公司合成。

以基因组 DNA 为模板,PCR 扩增目的 DNA 片段。PCR 反应体系为 25 μL,其中包括 PCR Master

Mix(x2)、DNA 模板、5'端和 3'端 PCR 引物、ddH<sub>2</sub>O。反应条件:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,42~52 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 40 s,34~40 个循环,72 °C 再延伸 10 min,采用热启动 PCR 法扩增。取 PCR 产物 5 μL,在 2.0% 琼脂糖凝胶上电泳,用 100 bp 的 DNA 标记进行产物鉴定。

PCR 产物经纯化后,送北京华大基因科技股份有限公司行序列测定,测序结果与 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> 上提供的标准序列比对,进行突变位点的鉴定。

## 2 结果

### 2.1 外显子组测序结果

采用 Nimblegen 的 HD2 芯片对 3 例患者和 1 例配偶进行外显子组捕获及测序,输出的原始数据与参考外显子基因组序列比对,得到目标样本外显子区域 SNPs/InDels 数据库。首先,将 3 例患者的 SNPs 或突变分别与正常对照的 SNPs 进行比对,剔除与疾病无关的突变位点,形成 3 例患者的测序候选 SNPs 或突变数据集;随后,通过与 NCBI dbSNP、Hapmap8 SNP 数据库、千人基因组计划、炎黄计划进行 SNPs 或突变位点的比对,剔除已知 SNPs 或突变,形成新的 3 例患者的测序候选 SNPs 或突变数据集;最后,再进行 3 例患者 SNPs 或突变数据库的比较,最终得到 3 例共有的 41 个潜在基因变异位点,供进一步分析验证。

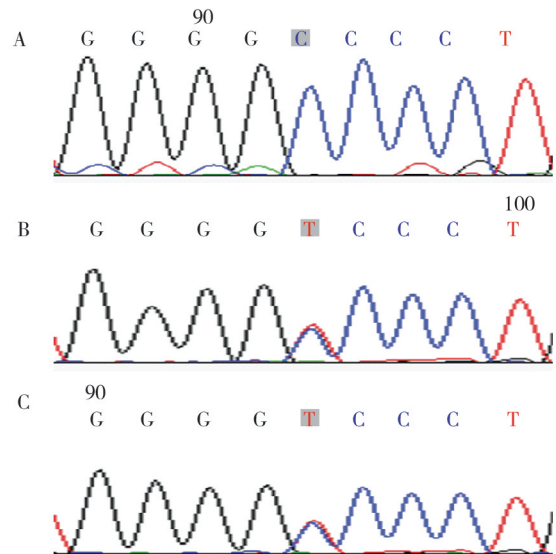
### 2.2 候选基因变异的 Sanger 测序

对核心家系现存的 3 代 9 人和家系外听力正常者 2 人进行 41 个候选耳聋基因相关突变的 PCR 扩增和 Sanger 测序,结果显示:除 FOXD4L1、PRKD1 和 ALOX15B 外,其余 38 个基因变异均不存在与家系耳聋表型的共分离。进一步分析发现,FOXD4L1 及 PRKD1 突变在正常对照的序列中也检测到,由此确定仅 ALOX15B 可能为家系耳聋的致病基因(图 2)。

随后,对 50 例作为研究对照的听力正常人的 DNA 样本进行 ALOX15B 基因候选耳聋突变位点的 PCR 扩增,产物经测序分析后显示,2 例对照也检测到与病例组相同的 ALOX15B 碱基变异(图 2C),从而排除了 ALOX15B 突变与家系耳聋表型的相关性。

## 3 讨论

有关 AN 分子病因学的研究虽起步较晚,但遗



A:家系配偶Ⅲ2,无 C>T 突变;B、C:患者Ⅲ1 及 1 名听力正常对照,均见 C>T 突变。

图 2 ALOX15B 基因 7942797 位点测序结果

Figure 2 Partial sequence chromatograms of ALOX15B gene from a family spouse

传因素在 AN 发病中的作用正日益受到国内外学者的关注,迄今已有数个相关基因被克隆,为深入探讨 AN 的分子机制奠定了良好的基础。

2003 年,Varga 等<sup>[5]</sup>在对 4 个隐性非综合征型 AN 家系进行研究时,连锁分析发现其耳聋表型可连锁到 OTOF 基因上。OTOF 位于常染色体 2p22-23 区,含 48 个外显子,编码囊泡突触转运蛋白 otoferlin,后者广泛存在于耳蜗内毛细胞。可见,OTOF 是 1 个对内毛细胞功能具有重要调节作用的基因,该基因的突变可造成选择性内毛细胞损伤,导致 AN 表型。近期研究发现,该基因突变是我国先天性 AN 婴幼儿最主要的致病原因<sup>[16]</sup>。

2006 年,Delmaghani 等<sup>[9]</sup>报道了 4 个隐性非综合征型 AN 伊朗家系,在其中 1 个家系中检测到 DFNB59 基因 161C→T 错义突变(T54I),另 3 个家系中检测到该基因的 547C→T 错义突变(R183W)。DFNB59 位于染色体 2q31.1-q31.3,含 7 个外显子,编码由 352 个氨基酸组成的蛋白 Pejvakin,后者在耳蜗 Corti 器、螺旋神经节细胞以及前三级听觉传入通路(耳蜗核、上橄榄复合体、下丘)的神经细胞中均有表达。目前已证实,DFNB59 突变除导致隐性综合征型和非综合征型 AN 外,还可引起以外毛细胞损害为主的感音性听力损失以及中枢前庭功能异常等多种表现<sup>[17-18]</sup>。

1999 年,DeJonghe 等<sup>[19]</sup>首先在 Charcot-Marie-Tooth



病(又称遗传性感觉运动神经病,HSMN)伴 AN 家系患者中发现了髓鞘蛋白零(myelin protein zero,MPZ)基因的 Tyr124Met 突变。之后,Starr 等<sup>[8]</sup>通过对 1 个 HSMN 伴 AN 家系的分子遗传学研究发现,MPZ 基因的 145 位丝氨酸发生了错义突变(Tyr145Ser)。可见,MPZ 是 1 个与综合征型 AN 有关的致病基因。该基因突变可造成螺旋神经节细胞以及中枢和耳蜗内听神经纤维的大量缺失,而内、外毛细胞的形态和数量正常或基本正常<sup>[8]</sup>。

包括本研究家系在内,国际文献至今共报道了 5 个常染色体显性遗传的非综合征型 AN 家系<sup>[1,4,11,20-21]</sup>,其中仅有 2 个家系的耳聋被证实由 DIAPH3 基因 5' UTR 高度保守的 GC 框突变(c.-172G>A,c.-173C>T)所致<sup>[3-4]</sup>,即 DIAPH3 是迄今克隆的惟一与显性遗传性 AN 相关的致病基因。DIAPH3 位于染色体 13q21.2,含 29 个外显子,编码多种 diaphanous 蛋白。对鼠模型的研究发现,diaphanous-2 蛋白对皮质和海马神经元树突棘的活性是必要的,故推测其参与内毛细胞突触后部的形成<sup>[22]</sup>。DIAPH3 基因 5'UTR 区 GC 框高度保守的序列可调节该基因的转录,该区域突变可能降低了 DIAPH3 基因转录抑制子的结合,导致 mRNA 及蛋白的过表达,进而可能通过对内毛细胞突触的直接影响而导致耳聋的发生。

除上述基因外,Wang 等<sup>[10]</sup>报道在 1 个 AN 散发病例中检测到 mtDNA 12SrRNA T1095C 突变。最近,该课题组还在国际上首次报道了凋亡诱导因子基因 AIFM1 突变可导致 X-连锁隐性 AN<sup>[7]</sup>,并在一组散发 AN 患者中检测到该基因较高频率的错义突变,提示 AIFM1 可能是除 OTOF 以外的又 1 个常见 AN 致病基因。

在前期研究中,本课题组先后对核心家系耳聋个体进行了 mtDNA 12SrRNA、OTOF、MPZ、DFNB59 及 DIAPH3 基因的全序列分析,排除了上述已知 AN 致病基因突变导致本家系耳聋表型的可能性<sup>[11-15]</sup>。本研究采用外显子组测序技术,结合生物信息学分析和 PCR-Sanger 测序,结果在该家系 AN 患者中仍未检测到有意义的突变,进而排除了该家系由全外显子 SNPs 及 Indels 致病的可能性。至此可基本确定,该 AN 家系中存在除基因编码区突变及 Indels 以外的突变形式,如基因编码区大片的缺失。进一步研究有望最终揭示家系耳聋的分子机制。

#### [参考文献]

[1] Wang Q, Gu R, Han D, et al. Familial auditory neuropathy[J].

Laryngoscope,2003,113(9):1623-1629

- [2] Manchaiah VKC, Zhao F, Danesh AA, et al. The genetic basis of auditory neuropathy spectrum disorder (ANSD) [J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol,2011,75(2):151-158
- [3] Schoen CJ, Emery SB, Thorne MC, et al. Increased activity of Diaphanous homolog3(DIAPH3)/ diaphanous causes hearing defects in humans with auditory neuropathy and in Drosophila[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2010,107(30):13396-13401
- [4] Sánchez-Martínez A,Benito-Orejas JI,Tellería-Oriols JJ, et al. Autosomal dominant auditory neuropathy and variant DIAPH3 (c.-173C>T)[J]. Acta Otorrinolaringol Esp,2016,68(3):183-185
- [5] Varga R, Kelley PM, Keats BJ, et al. Non-syndromic recessive auditory neuropathy is the result of mutations in otoferlin (OTOF) gene[J]. J Med Genet,2003,40(1):45-50
- [6] Al-Wardy NM, Al-Kindi MN, Al-Khabouri MJ, et al. A novel missense mutation in the C2C domain of otoferlin causes profound hearing impairment in an Omani family with auditory neuropathy[J]. Saudi Med J,2016,37(10):1068-1075
- [7] Zong L, Guan J, Ealy M, et al. Mutations in apoptosis-inducing factor cause X-linked recessive auditory neuropathy spectrum disorder[J]. J Med Genet,2015,52(8):523-531
- [8] Starr A, Michalewski HJ, Zeng FG, et al. Pathology and physiology of auditory neuropathy with a novel mutation in the MPZ gene (Tyr145→Ser) [J]. Brain,2003,126(Pt7):1604-1619
- [9] Delmaghani S, Delcastillo FJ, Michel V, et al. Mutations in the gene encoding pejvakin, a newly identified protein of the afferent auditory pathway, cause DFNB59 auditory neuropathy[J]. Nat Genet,2006,38(7):770-778
- [10] Wang Q, Li R, Zhao H, et al. Clinical and molecular characterization of a Chinese patient with auditory neuropathy associated with mitochondrial 12S rRNA T1095C mutation[J]. Am J Med Genet A,2005,133A(1):27-30
- [11] Xing G, Cao X, Tian H, et al. Clinical and genetic features in a Chinese pedigree with autosomal dominant auditory neuropathy[J]. ORL J Otorhinolaryngol,2007,69(2):131-136
- [12] 徐 帅,邢光前,曹 新,等.常染色体显性遗传性听神经病 OTOF 基因突变筛查[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2007,21(16):735-737
- [13] 周 涵,徐 帅,陈智斌,等.常染色体显性遗传性听神经病 MPZ 基因序列分析[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2008,28(9):1113-1115

(下转第 1050 页)

- duction, 2015,30(1): 170-178
- [5] Nelson SM, Klein BM, Arce JC. Comparison of antimüllerian hormone levels and antral follicle count as predictor of ovarian response to controlled ovarian stimulation in good-prognosis patients at individual fertility clinics in two multicenter trials [J]. *Fertil Steril*,2015,103(4): 923-930
- [6] Knez J, Kovacic B, Medved M, et al. What is the value of anti-Müllerian hormone in predicting the response to ovarian stimulation with GnRH agonist and antagonist protocols[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2015,13(1): 58
- [7] Aghssa MM, Tarafdari AM, Tehraninejad ES, et al. Optimal cutoff value of basal anti-mullerian hormone in iranian infertile women for prediction of ovarian hyperstimulation syndrome and poor response to stimulation[J]. *Reprod Health*,2015,12(1): 1-8
- [8] Salmassi A, Mettler L, Hedderich J, et al. Cut-off levels of anti-mullerian hormone for the prediction of ovarian response, in vitro fertilization outcome and ovarian hyperstimulation syndrome[J]. *Int J Fertil Steril*,2015,9(2): 157
- [9] Smith V, Osianlis T, Vollenhoven B. Prevention of ovarian hyperstimulation syndrome: A Review[J]. *Obstet Gynecol Int*,2015,2015:514159
- [10] Fiedler K, Ezcurra D. Predicting and preventing ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): the need for individualized not standardized treatment[J]. *Reprod Biol Endocrinol*,2012,10(1): 32
- [11] Chen CD, Chen SU, Yang YS. Prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*,2012,26(6): 817-827
- [12] Shmorgun D, Claman P. The diagnosis and management of ovarian hyperstimulation syndrome[J]. *JOGC*,2011, 33(11): 1156-1162
- [13] Ocal P,Sahmay S,Cetin M, et al. Serum anti- Müllerian hormone and antral follicle count as predictive markers of OHSS in ART cycles[J]. *J Assist Reprod Genet*,2011,28(12) : 1197-1203
- [14] Broer S L, Dolleman M, Opmeer B C, et al. AMH and AFC as predictors of excessive response in controlled ovarian hyperstimulation: a meta-analysis[J]. *Hum Reprod Update*,2011,17(1): 46-54
- [15] Lee TH, Liu CH, Huang CC, et al. Serum anti-Müllerian hormone and estradiol levels as predictors of ovarian hyperstimulation syndrome in assisted reproduction technology cycles[J]. *Hum Reprod*,2008,23(1): 160-167
- [16] Nardo Luciano G, Gelbaya Tarek A, Wilkinson Hannah, et al. Circulating basal anti- Müllerian hormone levels as predictor of ovarian response in women undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization [J]. *Fertil Steril*, 2009,92(5): 1586-1593

[收稿日期] 2016-07-29

(上接第 1032 页)

- [14] 徐 帅,陈智斌,鲁雅洁,等.常染色体显性遗传性听神经病 DFNB59 基因序列分析[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*,2008,22(19):880-882
- [15] 卢新红,陈睿春,鲁雅洁,等.常染色体显性遗传性听神经病家系候选致病基因突变筛查[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*,2012,26(10):455-458
- [16] Zhang QJ,Han B,Lan L,et al. High frequency of OTOF mutations in Chinese infants with congenital auditory neuropathy spectrum disorder[J]. *Clin Genet*,2016,90(3):238-246
- [17] Collin RWJ, Kalay E, Oostrik J, et al. Involvement of DFNB59 mutations in autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment[J]. *Hum Mutat*,2007,28(7):718-723
- [18] Ebermann I, Walger M, Scholl HP, et al. Truncating mutation of the DFNB59 gene causes cochlear hearing impairment and central vestibular dysfunction[J]. *Hum Mutat*,2007,28(6):571-577
- [19] DeJonghe P, Timmerman V, Ceuterick C, et al. The Thr124Met mutation in the peripheral myelin protein zero (MPZ) gene is associated with a clinically distinct Charcot-Marie-Tooth phenotype [J]. *Brain*,1999,122 (Pt2): 281-290
- [20] Bonfils P, Avan P, Londero A, et al. Progressive hereditary deafness with predominant inner hair cell loss [J]. *Am J Otol*,1991,12(3):203-206
- [21] Starr A, Isaacson B, Michalewski HJ, et al. A dominantly inherited progressive deafness affecting distal auditory nerve and hair cells[J]. *J Assoc Res Otolaryngol*,2004,5(4):411-426
- [22] Hotulainen P, Llano O, Smirnov S, et al. Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis[J]. *J Cell Biol*,2009,185(2):323-339

[收稿日期] 2017-02-13