

· 临床研究 ·

# GNB1 基因突变致神经发育障碍患儿的临床及基因突变分析

邵彬彬, 乔凤昌, 王 陈, 王 艳, 张菁菁, 刘 安, 胡 平, 许争峰\*

南京医科大学附属妇产医院(南京市妇幼保健院)产前诊断科, 江苏 南京 210004

**[摘要]** 目的:应用全外显子测序技术(whole exome sequencing, WES)对患有语言运动发育迟缓及严重智力障碍的患儿及其父母进行分析,探讨基因水平的遗传学病因并明确临床诊断,进一步指导妊娠。方法:提取患儿及其父母外周血DNA,采用外显子捕获结合高通量测序技术进行检测。根据美国医学遗传学与基因组学学会标准对患儿及父母检测出的变异进行致病性判定,结合患儿表型寻找致病基因及位点。利用Sanger测序法对致病位点进行验证。结果:患儿GNB1基因第7号外显子c.346 G>A(p.G116S)位点杂合错义突变为致病位点,患儿父母该位点均为野生型,此变异为患儿的新发突变。Sanger测序验证结果与外显子捕获测序结果一致。患儿为常染色体显性智力低下42型(autosomal dominant mental retardation-42, MRD42)患者。结论:应用全外显子测序技术对语言运动发育迟缓伴严重智力低下的患儿进行诊断,可明确患儿的致病原因,有助于家系的遗传咨询并为再生育提供指导。

**[关键词]** 全外显子测序技术;GNB1基因;常染色体显性智力低下42型;新发突变;遗传咨询

**[中图分类号]** R715.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2019)10-1472-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20191013

常染色体显性智力低下42型(autosomal dominant mental retardation-42, MRD42, OMIM#616973)是以神经发育障碍为主要特点的疾病,包括生长发育迟缓、严重智力障碍、肌张力低下、癫痫发作、斜视及皮质视觉受损等。致病基因为GNB1(G protein subunit beta 1)<sup>[1-2]</sup>。神经发育障碍(neurodevelopmental disorders, NDDs)包括智力障碍、癫痫和自闭症,是由中枢神经系统发育异常引起的一组遗传性疾病,具有遗传异质性<sup>[3]</sup>。据报道,已有700多个基因与中枢神经系统发育异常导致的智力障碍相关,临床诊断困难<sup>[4-5]</sup>。全外显子测序技术在临床上的应用与推广,为明确智力障碍的遗传学病因和发现新基因提供了有效方法<sup>[6-7]</sup>。与此同时,针对核心家系的全外显子测序技术为发现以单核苷酸变异(single nucleotide variants, SNVs)和插入缺失(short insertions and deletions, indels)为主的新发突变提供了可能<sup>[8-9]</sup>。

本研究利用全外显子测序技术对神经发育障碍的患儿及其父母进行检测,结合患儿临床表型及

生物信息学分析,发现患儿GNB1基因存在1个新发错义突变c.346 G>A(exon 7)p.G116S,为明确诊断常染色体显性智力低下42型和遗传咨询提供依据。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

患儿,男,汉族,系38<sup>+</sup>5周足月生理产,出生体重3.45 kg,出生后眼球震颤,喂养困难,3个月不能抬头,10个月翻身困难,脑电图及头颅磁共振结果未见异常。现5岁2个月,体重10.5 kg(<中位数-3倍标准差),身高90 cm(<中位数-3倍标准差),斜视,抓握能力差,重度智力低下(IQ25),尚不会讲话(只能发无意义的单字),不能独自站立及行走。父母非近亲结婚,无遗传病家族史。2018年10月来南京医科大学附属妇产医院院遗传医学中心就诊,染色体微阵列检测未发现染色体结构异常和拷贝数变异。经患儿家长知情同意,签署知情同意书,对患儿进行全外显子测序检测寻找致病基因及位点,本研究获得医院伦理委员会的批准。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 DNA提取

抽取患儿及其父母外周静脉血2 mL,使用EDTA抗凝。采用全血DNA提取试剂盒(QIAamp,

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81602300, 81770236)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhengfeng\_xu\_nj@163.com

QIAGEN公司,德国)提取400 μL外周血基因组DNA,所得浓度均>50 ng/μL,总DNA量>2.0 μg, D(260 nm)/D(280 nm)为1.8~2.0,外周血与基因组DNA样本-20℃保存。

### 1.2.2 全外显子测序

超声随机打断基因组DNA,经过纯化、建库、杂交捕获等过程后进行测序;测序结果经质量控制,用BWA0.6.2-r126软件与参考基因组(UCSC hg19)进行比对,数据分析去除接头序列、重复序列及低质量数据,再经过GATK软件重新比对和碱基质量校正,对得出单核苷酸变异和插入缺失进行注释,并对测序深度、覆盖深度及均一性等进行统计。

### 1.2.3 生物信息学分析

通过 dbSNP137 (<http://www.bioinfo.org.cn/relative/dbSNP%20Home%20Page.htm>)、the 1000 Genomes Project (<http://www.internationalgenome.org/>)、ExAC Browser (<http://exac.broadinstitute.org/>)、Genome Aggregation Database (<http://gnomad-old.broadinstitute.org/>)等数据库获得变异的最小等位基因频率,SIFT (<http://sift.jcvi.org/>)、Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>)、Polyphen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)及CADD (<http://cadd.gs.washington.edu/>)等软件进行危害性预测,蛋白质结构预测软件AnthePro、Swiss-model及PyMOL对蛋白的功能影响进行预测,再结合OMIM、Decipher、NCBI等数据库,根据美国医学遗传学与基因组学会(ACMG)分级标准对突变位点进行致病性判断。

### 1.2.4 Sanger测序验证

对GNB1基因突变点进行家系验证。使用NCBI在线软件设计聚合酶链式反应引物,由苏州金唯智公司合成,上游引物:5'-TGCAGATGCAACTC-TCTCTCAG-3',下游引物:5'-AGTGTGTCCGGTA-AACGTGG-3',产物大小为478 bp。PCR扩增试剂2×Taq Master Mix购自南京诺唯赞有限公司。PCR反应体系为50 μL,包括25 μL dNTP mix,10 μmol/L上、下游引物各2 μL,2 μL DNA模板,19 μL ddH<sub>2</sub>O。反应条件:95℃ 10 min,95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,72℃ 10 min,共35个循环。PCR扩增产物送苏州金唯智公司进行测序验证。

## 2 结果

### 2.1 全外显子测序结果及致病性判断

对患儿及其父母外周血DNA进行全外显子测序及生物信息学分析,发现患儿GNB1基因第7号外

显子存在1个错义杂合突变c.346 G>A(p.G116S),患儿父母此位点为野生型。样本的有效读数、测序深度及覆盖度见表1。c.346 G>A(p.G116S)在不同物种间高度保守(表2),该突变位点在千人基因组、dbSNP、ExAC及gnomAD数据库中未见报道,Mutation Taster、SIFT、Polyphen-2及CADD预测软件均预测该变异是有害的,蛋白质结构预测软件AnthePro和Swiss-model提示c.346 G>A(p.G116S)影响蛋白质的二级结构,并使氢键断裂重排(图1)。该突变位点位于已报道的热点区域,异三聚体G蛋白三级结构模式图提示该突变位点位于G蛋白β亚基与α亚基的结合面(图2),因此该位点的突变可能会对蛋白质的结构及功能产生影响。参照ACMG 2015年分级标准,我们将GNB1基因的c.346 G>A杂合突变分级为可能致病性突变,变异证据为1个强证据(PS2),2个中等证据(PM1+PM2),3个辅助证据(PP2+PP3+PP4)。

表1 测序数据量

ID	有效读数(Mb)	平均测序深度(X)	覆盖度(%)	>30X目标覆盖度(%)	Q20
患儿	8.995	96	99.7	97.5	0.98
父亲	6.213	68	99.8	91.9	0.97
母亲	5.299	54	99.7	95.3	0.96

X:高通量测序读长;Q20:测序过程中碱基识别的错误概率为1%。

表2 不同物种c.346 G>A(p.G116S)突变位点同源序列比对

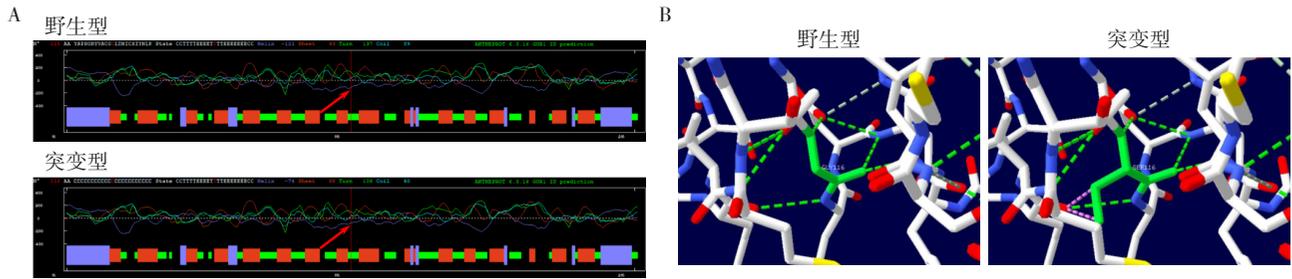
物种	基因	氨基酸序列
人类	ENSG00000078369	YAPSGNYVACGGLDNI
猕猴	ENSMMUG00000001896	YAPSGNYVACGGLNNI
猫	ENSFCAG00000012371	YAPSGNFVACGGLDNM
小鼠	ENSMUSG00000029064	YAPSGNYVACGGLDNI
鸡	ENSGALG00000001334	YAPSGNYVACGGLDNI
牛	ENSTRUG00000000699	YAPSGNYVACGGLDNI
斑马鱼	ENS DARG00000060360	YAPSGNYVACGGLDNI
黑腹果蝇	EBgn0001105	YAPSGSYVACGGLDNM
线虫	F13D12.7	YAPSGSYVACGGLDNI

### 2.2 变异验证

Sanger测序结果与全外显子捕获测序结果一致,患儿GNB1基因第7号外显子存在c.346 G>A(p.G116S)杂合错义突变,患儿父母未携带该致病变异,该变异为“新发突变”(图3)。

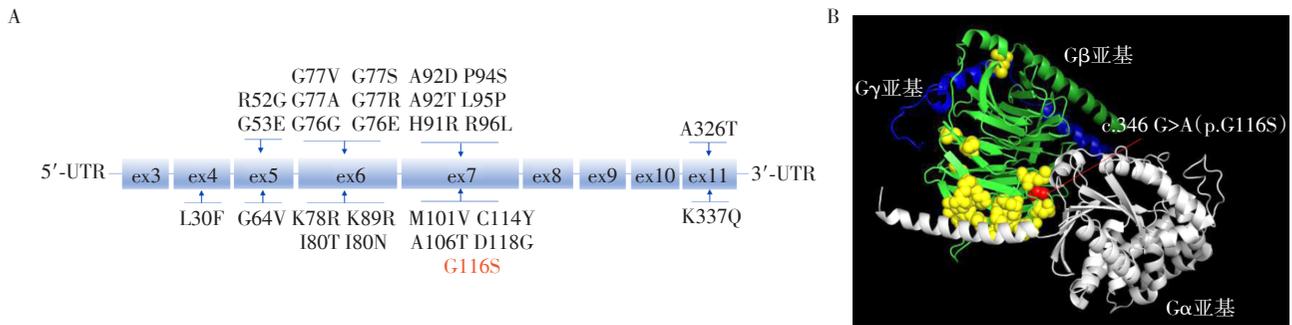
## 3 讨论

GNB1基因(NM\_002074.5)位于1p36.33,全长



A: AnthePro 软件预测 c.346 G>A 影响蛋白质的二级结构:α螺旋评分由-121 变为-74,β折叠评分由 43 变为 68(红色箭头);B:Swiss-model 提示 c.346 G>A 使氢键断裂重排(紫色虚线)。

图1 蛋白质结构预测软件对突变位点进行预测



A: 蓝色标注为已报道突变位点在GNB1 各外显子上的分布,红色为 c.346 G>A(p.G116S);B: 灰色为 G 蛋白α亚基,绿色为 G 蛋白β亚基,蓝色为 G 蛋白γ亚基,黄色为已报道突变位点,红色为 c.346 G>A(p.G116S)。

图2 突变位点定位

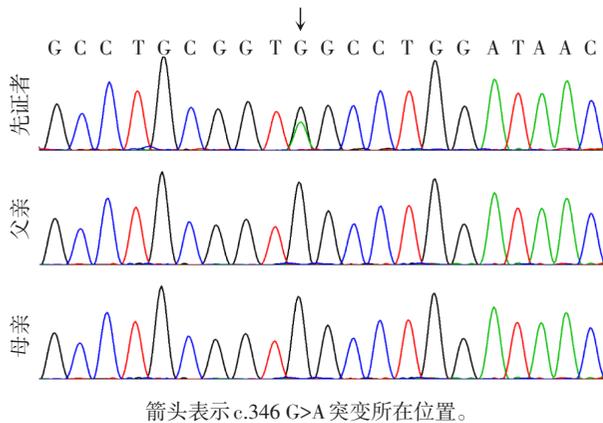


图3 Sanger 测序验证患儿GNB1 基因的杂合突变

3 163 bp,有 12 个外显子,编码 340 个氨基酸。GNB1 编码的 G 蛋白β亚基与α及γ亚基形成异源三聚体,在静息状态时,Gα亚基与 Gβγ异源二聚体紧密结合,当配体与 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)结合时,激活 G 蛋白,使 Gα亚基与 Gβγ亚基分离,从而调节下游信号转导<sup>[10]</sup>。体外研究表明,GNB1 基因 p.K89E 突变的肿瘤细胞系中,GNB1 编码的β亚基与α亚基结合减少,促使 AKT、mTOR 及 ERK 信号通路活性增加。GNB1 敲除的小鼠模型中,神经前体细胞增殖受到抑制,40%胚胎期

小鼠出现神经管畸形,脑皮质变薄,60%出现小头畸形且出生后 2 d 死亡<sup>[2,11]</sup>。

Petrovski 等<sup>[1]</sup>于 2016 年初次报道 GNB1 基因突变与 MRD42 密切相关,13 例全面发育迟滞患者中均检测到 GNB1 基因新发错义突变,且突变位点集中分布于第 6 号外显子(9/13),通过影响β亚基与α亚基结合导致疾病。这些患者中 11 例存在肌张力低下(11/13),10 例伴有癫痫(10/13),8 例存在眼科异常(8/13)。随后,Brett 等<sup>[12]</sup>首次在中国人群中 对 1 例 GNB1 基因突变导致神经发育障碍伴急性淋巴细胞白血病的患儿进行分析,提示 GNB1 基因突变会增加患者伴发血液系统肿瘤的风险。结合已有文献报道,GNB1 基因突变致神经发育障碍共有 46 例,主要表现为发育迟缓(46/46),肌张力减退(36/46),语言发育迟滞(30/46)和癫痫(23/46),其中 24 例患者头颅磁共振显像异常(24/46)。GNB1 基因突变类型包括错义突变、剪切突变和移码突变,其中错义突变为主要变异类型<sup>[2,13-14]</sup>。本研究中,患儿 GNB1 基因第 7 号外显子存在 1 个新发杂合错义突变 c.346 G>A(p.G116S),该突变位点此前未有报道,蛋白质结构预测软件 AnthePro 和 Swiss-model 提示 c.346 G>A(p.G116S)影响蛋白质的二级结构,并使

氢键断裂重排。该突变位点位于热点区域, G蛋白三级结构模式图提示 c.346 G>A 位于 G 蛋白 $\beta$ 亚基与 $\alpha$ 亚基的结合面, 因此我们推测 c.346 G>A (p. G116S) 通过抑制 $\beta$ 亚基与 $\alpha$ 亚基结合, 降低异三聚体 G 蛋白的稳定性, 影响下游通路信号转导。此家系中, c.346 G>A 为患儿可能致病性突变, 患儿父母未携带该致病变异, 再发的概率较低, 但是不能完全排除双亲生殖细胞嵌合可能。患儿父母有再生育要求, 再次妊娠后应行产前诊断明确胎儿基因型, 排除胎儿患病可能。

传统的 Sanger 测序法是对每个外显子进行直接测序, 具有简便、准确等优点, 但是神经发育障碍致病基因众多, 使得直接测序工作量大, 成本高。全外显子测序技术使用接头进行高通量并行 PCR 及测序反应, 具有测序覆盖深度深, 数据准确性高等优点<sup>[15]</sup>, 虽然外显子序列仅占人类全基因组序列的 1%, 但与人类疾病相关的 85% 基因突变都位于这些编码序列和剪切位点<sup>[16]</sup>, 因此, 全外显子检测技术作为临床遗传病诊断的有效工具, 将得到更广泛的应用。

综上所述, 本研究应用外显子捕获测序技术在我国 1 例神经发育障碍患者中发现 GNB1 基因新发突变, 为患者的遗传学分子诊断和遗传咨询提供了证据, 进一步证实了全外显子测序技术在神经发育障碍中的临床应用价值。

#### [参考文献]

[1] Petrovski S, Kury S, Myers CT, et al. Germline De Novo mutations in GNB1 cause severe neurodevelopmental disability, hypotonia, and seizures [J]. *Am J Hum Genet*, 2016, 98(5): 1001-1010

[2] Yoda A, Adelmant G, Tamburini J, et al. Mutations in G protein beta subunits promote transformation and kinase inhibitor resistance [J]. *Nat Med*, 2015, 21(1): 71-75

[3] Thapar A, Cooper M, Rutter M. Neurodevelopmental disorders [J]. *Lancet Psychiatry*, 2017, 4(4): 339-346

[4] Vissers LE, Gilissen C, Veltman JA. Genetic studies in intellectual disability and related disorders [J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(1): 9-18

[5] Martinez F, Caro-Llopis A, Rosello MA, et al. High diag-

nostic yield of syndromic intellectual disability by targeted next-generation sequencing [J]. *J Med Genet*, 2017, 54(2): 87-92

[6] Li J, Gao K, Yan H, et al. Reanalysis of whole exome sequencing data in patients with epilepsy and intellectual disability/mental retardation [J]. *Gene*, 2019, 700: 168-175

[7] Fischer-Zirmsak B, Segebrecht L, Schubach M, et al. Haploinsufficiency of the notch ligand DLL1 causes variable neurodevelopmental disorders [J]. *Am J Hum Genet*, 2019, 105(3): 631-639

[8] Veltman JA, Brunner HG. De novo mutations in human genetic disease [J]. *Nat Rev Genet*, 2012, 13(8): 565-575

[9] Wilfert AB, Sulovari A, Turner TN, et al. Recurrent de novo mutations in neurodevelopmental disorders: properties and clinical implications [J]. *Genome Med*, 2017, 9(1): 101

[10] Roskopf D, Nikula C, Manthey I, et al. The human G protein beta 4 subunit: gene structure, expression, G gamma and effector interaction [J]. *FEBS Lett*, 2003, 544(1/3): 27-32

[11] Okae H, Iwakura Y. Neural tube defects and impaired neural progenitor cell proliferation in G beta 1-deficient mice [J]. *Dev Dyn*, 2010, 239(4): 1089-1101

[12] Brett M, Lai AH, Ting TW, et al. Acute lymphoblastic leukemia in a child with a de novo germline gnb1 mutation [J]. *Am J Med Genet A*, 2017, 173(2): 550-552

[13] Hemati P, Revah-Politi A, Bassan H, et al. Refining the phenotype associated with GNB1 mutations: Clinical data on 18 newly identified patients and review of the literature [J]. *Am J Med Genet A*, 2018, 176(11): 2259-2275

[14] Szczaluba K, Biernacka A, Szymanska K, et al. Novel GNB1 de novo mutation in a patient with neurodevelopmental disorder and cutaneous mastocytosis: Clinical report and literature review [J]. *Eur J Med Genet*, 2018, 61(3): 157-160

[15] 吴 亮, 刘婷婷, 魏钦俊, 等. 常染色体显性遗传性听神经病家系全外显子组测序分析 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(8): 1029-1032, 1050

[16] Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, et al. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder [J]. *Nat Genet*, 2010, 42(1): 30-35

[收稿日期] 2019-06-26