

FAN1 基因 c.1799A>T 突变与巨核细胞性间质性肾炎的关联

刘珍玉^{1,2a}, 张俊宁^{1,2a}, 杨雪丽^{1,2a}, 王广宇^{1,2a}, 侯显良^{1,2b}

(1. 桂林医学院第二附属医院中心实验室, 桂林 541199; 2. 桂林医学院 a. 临床医学院, b. 医学检验学院, 桂林 541199)

摘要 **目的** 探究巨核细胞性间质性肾炎(KIN)与 *FAN1* 基因突变的关联性。**方法** 2022 年 10 月, 发现一个家族聚集性肾炎家系。对家系成员进行全外显子组测序以确定候选基因, 并通过 Alpine 分析、遗传变异判读和 Sanger 测序分析该基因。**结果** 肾病家系先证者临床表型为肾炎, 先证者母亲检出 *FAN1* 基因 c.1799A>T 突变。对家系中杂合性成员采用 Sanger 测序, 也检测到相同的突变基因, 依据美国医学遗传学与基因组学学会(ACMG)推荐指南, 将其归类为意义不明的基因突变。本研究中的家系性肾炎表型与 KIN 部分相符。**结论** 本研究中家系性肾炎的表型与 *FAN1* 基因 c.1799A>T 位点突变有密切关联。

关键词: 肾炎; *FAN1* 基因; 巨核细胞性间质性肾炎; 全外显子组测序

中图分类号: R692.3

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2024)03-0048-06

Correlation between c.1799A>T mutation in *FAN1* gene and karyomegalic interstitial nephritis

LIU Zhenyu^{1,2a}, ZHANG Junning^{1,2a}, YANG Xueli^{1,2a}, WANG Guangyu^{1,2a}, HOU Xianliang^{1,2b}

(1. Central Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541199, China; 2. a. College of Clinical Medicine, b. College of Medical Laboratory, Guilin Medical University, Guilin 541199, China)

Abstract **Objective** To explore the correlation between karyomegalic interstitial nephritis (KIN) and *FAN1* gene mutations. **Methods** In October 2022, a family lineage of nephritis with familial aggregation was clinically confirmed in our department. The whole exome sequencings of the patients with nephritis were

基金项目: 中央引导地方科技发展基金资助(桂科 AD20238021)。

第一作者: 刘珍玉, 硕士研究生, 研究方向为遗传相关疾病。

通信作者: 侯显良, houx115@126.com。

performed to identify candidate genes. The genetic pathogenicity was analyzed using Alpine analysis, gene variant interpretation, and Sanger sequencing analysis. **Results** The clinical phenotype of the patients from a family with nephropathy was nephritis. A c.1799A>T mutation in *FAN1* gene was detected in the mother of the patients with nephritis. Sanger sequencing was performed on heterozygous members in the family, and the same mutated genes were also detected in a heterozygous member of this family. According to the recommended guidelines of American college of medical genetics and genomics (ACMG), it is classified as a gene mutation of unknown significance. The phenotype of familial nephritis in this study was partially consistent with that of KIN. **Conclusion** The phenotype of familial nephritis in this study is closely related to c.1799A>T site mutation in *FAN1* gene.

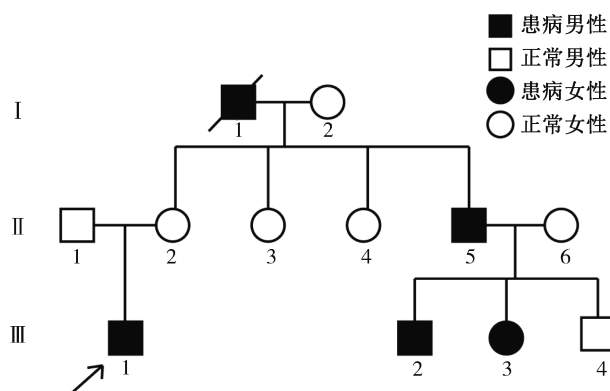
Keywords: nephritis; *FAN1* gene; karyomegalic interstitial nephritis; whole exome sequencing

巨核细胞性间质性肾炎(karyomegalic interstitial nephritis, KIN)是一种罕见的常染色体隐性遗传性肾小管间质性肾炎^[1]。它的特征是细胞核明显增大、深染和核仁突出,以肾小管上皮细胞受累为主并伴有间质明显纤维化。该疾病表现为无症状蛋白尿,并逐渐进展到慢性肾病,30~40年后,可进展到终末期肾病。1974年,BURRY^[2]对此病进行了报道。1979年,MIHATSCH等^[3]报告了3例此类疾病,并为此类疾病命名。NAKHOUL等^[4]提出,*FAN1*基因突变与巨核细胞性间质性肾炎有密切关系。CHAND等^[5]认为,*FAN1*(*FANCD2*/*FANCD1*-相关核酸酶1)突变与此疾病也有关联,但*FAN1*突变致KIN的报告在国内外均少见。本文对某家系肾炎患者的临床特征进行分析,探讨其与*FAN1*的关联。

1 资料与方法

1.1 一般资料

广西壮族自治区桂林地区的某肾炎家系,先证者(Ⅲ1),男,36岁,临床表型为肾炎。先证者外公(Ⅰ1),舅舅(Ⅱ5),大表哥(Ⅲ2)和表姐(Ⅲ3)的临床表型均为肾炎,先证者母亲(Ⅱ2),大姨(Ⅱ4),二姨(Ⅱ3)和舅妈表型正常。本研究获得桂林医学院第二附属医院医学伦理委员会审查批准,患者签署知情同意书。本研究的家系图谱如图1所示。



注: I、II、III表示代数,1,2,3等表述每代的个体编号。

图1 肾炎家系图谱

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取 采集先证者及其父母、舅舅、舅妈、大姨、二姨、大表哥、二表哥和表姐等外周静脉血3~5 mL, EDTA抗凝, 4℃保存。采用QIAGEN DNA Blood Midi/Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, 德国)试剂盒从血样品中提取基因组DNA, 取1 μg采用超声打断。

1.2.2 全外显子组测序 将50 ng打断至200 bp左右的DNA片段进行末端修复和3'端加A操作, 随后DNA片段连接含Barcode序列的测序接头, 纯化连接产物后, 参照NanoWES芯片标准流程, 对预制的文库进行液相杂交捕获操作。将杂交产物洗脱、收集, 然后进行PCR扩增和纯化, 获得外显子文库。文库用qPCR进行定量, 采用Illumina平台(Illumina, San Diego, 美国)进行高通量测序, 经CASAVA v1.82

处理后得到原始数据。数据质量超过85%的碱基达到Q30以上($\geq Q30$)标准,超过95%的碱基达到Q20以上($\geq Q20$)标准,重复率不超过30%。

1.2.3 Sanger 测序验证 根据全外显子测序检测 *FAN1* 基因(NM_)c>T 突变位点,应用软件设计 PCR 引物。应用3730XL型 DNA Star (购自美国 ABI 公司)对先证者及其父母、大姨、二姨、舅舅、舅妈、表姐、大表哥和二表哥进行 Sanger 测序,应用 SeqMa 软件对测序结果与标准序列进行对比分析,绘制 Sanger 测序图。

1.2.4 生物信息学分析 基因组测序原始数据经质控过滤后,使用 Burrows-Wheeler Al 工具将测序序列与人类参考基因组(hg19/GRCh37)进行比较,使用 Picard 删除 PCR 重复序列(<http://picard.sourceforge.net/>)。变异检测分析由贝瑞基因研发的 Verita Trekker® 变体检测系统和 GATK (<https://software.broadinstitute.org/gatk/>)完成。变异注释由 ANNOVAR 和贝瑞基因研发的 Enliven® 变异注释解释系统完成。报告的解读依据美国医学遗传学和基因组学(ACMG)的遗传变异解析,将变异分为5类——“致病的”“可能致病的”“不确定的”“可能良性的”和“良性的”。考虑到 ACMG 的种类、致病性证据、相关疾病的临床表现和遗传模型,本研究对外显子区域中轻度等位基因频率(MAF) <0.5%或受剪接影响的变异进行探究。

变异注释由 ANNOVAR 和贝瑞基因研发的 Enliven® 变异注释解释系统完成。报告的解读依据美国医学遗传学和基因组学(ACMG)的遗传变异解析,将变异分为5类——“致病的”“可能致病的”“不确定的”“可能良性的”和“良性的”。考虑到 ACMG 的种类、致病性证据、相关疾病的临床表现和遗传模型,本研究对外显子区域中轻度等位基因频率(MAF) <0.5%或受剪接影响的变异进行探究。

2 结果

2.1 全外显子组测序

先证者有 *FAN1* 基因的 c.1799A>T 突变,突变位点在外显子的第5号;Sanger 测序的结果表明,先证者母亲、二姨、舅舅和表姐均存在 *FAN1* 基因 c.1799A>T 突变,测序结果如图2所示。

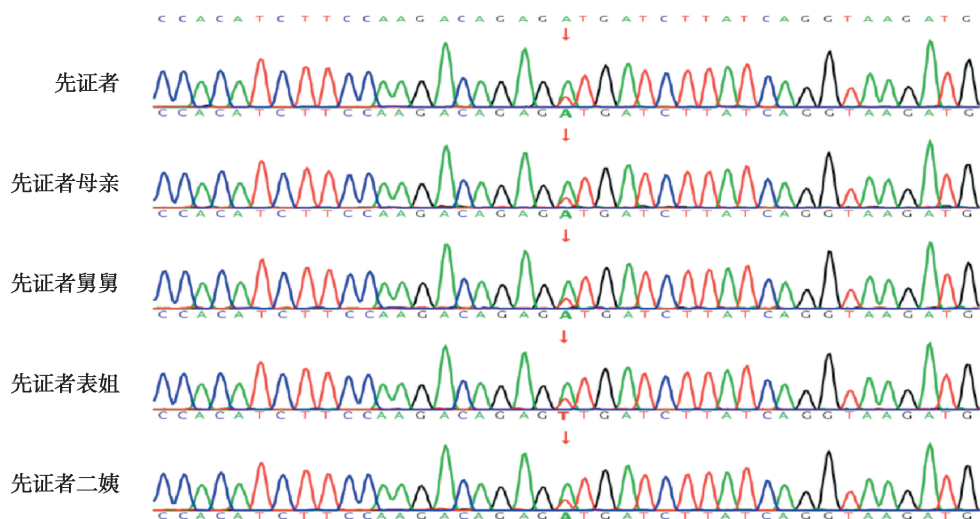


图2 *FAN1* 基因的 Sanger 测序图

2.2 生物信息学

根据美国医学遗传学与基因组学学会(ACMG)准则和 ClinGen 序列变异解释专家组关于准则标准应用的建议,发现基因 *FAN1* 中 c.1799A>T 突变是一个意义不明的突变位点。

2.3 全外显子组测序基因拷贝数变异

对本研究家系所有样本进行全外显子组基因拷贝数变异检测(whole exon sequencing-copy number variations, WES-CNV),发现先证者母亲 X 染色体上 q28 处有 0.92 Mb 的重复区域,结果如图3所示。按照 ACMG 指南,该基因拷贝数变异(CNV)的致病性评级为致病。

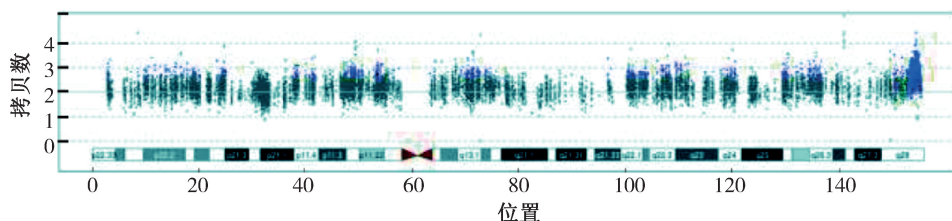
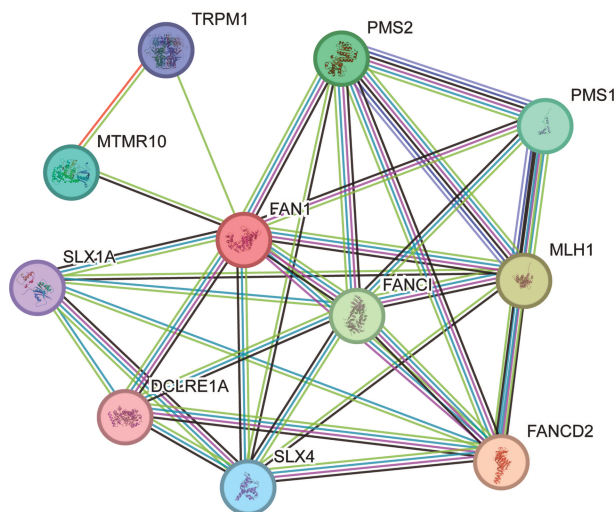


图3 先证者母亲全外显子组基因拷贝数变异检测

2.4 *FAN1* 蛋白与其他蛋白的相互作用

STRING 网站上的功能蛋白相互作用富集分析结果表明, *FAN1* 蛋白与 *SLX1A*、*PMS1*、*PMS2* 等蛋白之间存在相互作用, 网络结构如图4所示。

图4 *FAN1* 蛋白与其他蛋白的相互作用网络结构

2.5 *FAN1* 基因的杂合性

本研究家系的先证者父亲、舅妈、大姨、大表哥、二表哥的 *FAN1* 基因杂合性为野生型; 先证者及其母亲、舅舅、表姐和二姨的 *FAN1* 基因杂合性为杂合型。

3 讨论

KIN 是慢性肾脏疾病中的罕见遗传病^[6], 并伴有基因突变^[7], 至今已报告为常染色体隐性遗传病, 其发病机制尚不清楚。2012 年, ZHOU 等^[8]证实了 *FAN1* 基因是 KIN 的致病基因, 编码 DNA 修复核酸酶^[9], 是 DNA 修复通路中的关键酶^[10], 涉及 Fanconi 贫血 DNA 受损反应通路中 DNA 链之间交互连接的

修复, 在肾脏、肝脏及神经组织中存在一定优势表达, 受影响的器官可能会因 DNA 交互连接的方式不同, 最后可能出现不同的临床表现^[11]。本研究采用全外显子测序与 Sanger 测序, 发现先证者及其母亲、二姨、表姐、舅舅均为 *FAN1* 基因 c.1799A>T 突变杂合子, 先证者及其表姐、舅舅均患有肾炎, 但先证者母亲和二姨没有肾炎症状。

FAN1 基因编码的是一个具有 5' 核酸内切酶和 5'-3' 外切酶活性的蛋白质, 是一种高度保守的核酸酶, 由 SAP (SAF-A/B, Acinus, PIAS) 结构域、34 肽重复序列 (tetratricopeptide repeat, TPR) 结构域和病毒型复制修复核酸酶 (virus-type replication repair nuclease, VRR-NUC) 结构域组成^[12-17]。*FAN1* 基因包含 15 个外显子, 本研究中先证者基因的突变位点位于第 5 外显子。

FAN1 基因外显子位点的突变有 c.17 delA、c.22 delT、c.2616 delA、c.2485c>T 和 c.2928 dupT^[9,11,18]。敲除小鼠 *FAN1* 基因, 小鼠更加易感 KIN^[19]。KIN 患者的发病年龄和临床表型各不相同, 并且涉及多个系统。经公共数据库查询, *FAN1* 基因突变引起 KIN (OMIM:614817), 其主要表现为肾炎、慢性肾脏病、肾小管间质性肾炎、血尿、糖尿、肾消耗病、蛋白尿、肝脏转氨酶升高、血清肌酐水平增高、血尿素氮 (BUN) 增高。

本研究家系中 *FAN1* 基因有野生型和杂合型两种, 和先证者杂合性相同的家庭成员, 均有 *FAN1* 基因 c.1799A>T 位点的突变。虽然家系成员未检测到与 KIN 相关的致病性单核苷酸位点变异。但研究^[20]表明, 不同区域的单核苷酸多态性都可能会影响基因表达, 不同的作用模式影响不同。研究不同区域的单核苷酸多态性对疾病的影响是非常有价值的^[21]。

在本研究中,即使在同一家系或者同一突变位点,患者的发病年龄和临床表型也不同。先证者的母亲和二姨没有肾炎的临床表型,但是却存在 *FAN1* 基因 c.1799A>T 位点的变异。先证者舅舅患有精神病,这可能与 *FAN1* 基因也有着密切的关联^[22]。*FAN1* 拷贝数变异与自闭症、精神分裂症和癫痫有关^[23-26]。这些神经发育和神经系统的疾病,可能有其共同的遗传易感因素^[23-25,27-28]。这些临床表型与 *FAN1* 基因的 CNV 相关联,可能与 *FAN1* 蛋白表达水平有关,也可能与所处的环境有关。*FAN1* 在这些疾病中的作用,以及作用机制有待进一步研究。

4 结论

KIN 的疾病特征与本研究家系表型部分相符,*FAN1* 基因 c.1799A>T 位点突变可能是导致家系患者肾炎表型的原因。

参考文献

- [1] 姜玲,焦晨峰,程震.巨核细胞性间质性肾炎研究进展[J].东南国防医药,2022,8(1):73-76.
- [2] BURRY A F. Extreme dysplasia in renal epithelium of a young woman dying from hepatocarcinoma[J]. J Pathol, 1974, 113(3):147-150.
- [3] MIHATSCH M J, GUDAT F, ZOLLINGER H U, et al. Systemic karyomegaly associated with chronic interstitial nephritis. A new disease entity? [J]. Clin Nephrol, 1979, 12(2): 54-62.
- [4] NAKHOUL F, BEN ITZHAQ O, FARBER E. Karyomegalic interstitial nephritis with chronic kidney disease[J]. Isr Med Assoc J, 2015, 17(9):581-582.
- [5] CHAND M T, ZAKA A, QU H. Association of karyomegalic interstitial nephritis with focal segmental glomerulosclerosis[J]. Autops Case Rep, 2021, 11: e2021343.
- [6] LAW S, GILLMORE J, GILBERTSON J A, et al. Karyomegalic interstitial nephritis with a novel *FAN1* gene mutation and concurrent *ALECT2* amyloidosis[J]. BMC Nephrol, 2020, 21(1):74.
- [7] KOSHY P J, SUDHAKAR D V S, ANUPAMA S H, et al. Novel homozygous *FAN1* mutation in a familial case of karyomegalic interstitial nephritis[J]. Indian J Nephrol, 2020, 30(4):283-285.
- [8] ZHOU W B, OTTO E A, CLUCKEY A, et al. *FAN1* mutations cause karyomegalic interstitial nephritis, linking chronic kidney failure to defective DNA damage repair[J]. Nat Genet, 2012, 44(8):910-915.
- [9] REJEB I, JERBI M, JILANI H, et al. New familial cases of karyomegalic interstitial nephritis with mutations in the *FAN1* gene[J]. BMC Med Genomics, 2021, 14(1):160.
- [10] 桂宾. DNA 修复通路的关键酶: *FAN1* [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2010, 26(10):922.
- [11] ISNARD P, RABANT M, LABAYE J, et al. Karyomegalic interstitial nephritis: a case report and review of the literature[J]. Medicine, 2016, 95(20):e3349.
- [12] MACKAY C, DÉCLAIS A C, LUNDIN C, et al. Identification of KIAA1018/*FAN1*, a DNA repair nuclease recruited to DNA damage by monoubiquitinated *FANCD2* [J]. Cell, 2010, 142(1):65-76.
- [13] SMOGORZEWSKA A, DESETTY R, SAITO T T, et al. A genetic screen identifies *FAN1*, a Fanconi anemia-associated nuclease necessary for DNA interstrand crosslink repair[J]. Mol Cell, 2010, 39(1):36-47.
- [14] GWON G H, KIM Y, LIU Y Q, et al. Crystal structure of a Fanconi anemia-associated nuclease homolog bound to 5' flap DNA: basis of interstrand cross-link repair by *FAN1* [J]. Genes Dev, 2014, 28(20):2276-2290.
- [15] WANG R J, PERSKY N S, YOO B, et al. DNA repair. Mechanism of DNA interstrand cross-link processing by repair nuclease *FAN1* [J]. Science, 2014, 346(6213):1127-1130.
- [16] ZHAO Q, XUE X Y, LONGERICH S, et al. Structural insights into 5' flap DNA unwinding and incision by the human *FAN1* dimer[J]. Nat Commun, 2014, 5: 5726.
- [17] YAN P X, HUO Y G, JIANG T. Crystal structure of human Fanconi-associated nuclease 1 [J]. Protein Cell, 2015, 6(3):225-228.
- [18] WANG H, LI K, XIAO R, et al. Heterozygous variants in a patient with karyomegalic interstitial nephritis[J]. Nephron, 2023, 147(3/4):223-228.
- [19] AIRIK R, SCHUELER M, AIRIK M, et al. A *FANCD2*/*FANCI*-associated nuclease 1-knockout model develops karyomegalic interstitial nephritis[J]. J Am Soc Nephrol, 2016, 27(12):3552-3559.
- [20] 范广轩,王洪亮,邢秀梅. SNP 标记的研究进展及其应用[J/OL]. 特产研究: 1-9 [2024-04-19]. <http://doi.org/10.13930/j.cnki.cj.2024.04.001>.

- org/10.16720/j.cnki.tcyi.2023.209.
- [21] 贺晓蕾,戴勇,王沙燕,等.X连锁显性遗传性肾炎一家系相关基因排除定位分析[J].中国医师杂志,2004(11):1508-1510.
- [22] DESHMUKH A L, PORRO A, MOHIUDDIN M, et al. *FAN1*, a DNA repair nuclease, as a modifier of repeat expansion disorders[J]. J Huntingtons Dis, 2021, 10(1): 95-122.
- [23] FORSINGDAL A, FEJGIN K, NIELSEN V, et al. 15q13.3 homozygous knockout mouse model display epilepsy-, autism-and schizophrenia-related phenotypes [J]. Transl Psychiatry, 2016, 6(7): e860.
- [24] IONITA-LAZA I, XU B, MAKAROV V, et al. Scan statistic-based analysis of exome sequencing data identifies *FAN1* at 15q13.3 as a susceptibility gene for schizophrenia and autism[J]. Proc Natl Acad SciUSA, 2014, 111(1): 343-348.
- [25] CHEN J, CALHOUN V D, PERRONE-BIZZAZERO N I, et al. A pilot study on commonality and specificity of copy number variants in schizophrenia and bipolar disorder[J]. Transl Psychiatry, 2016, 6(5): e824.
- [26] JIAN X M, CHEN J H, LI Z Q, et al. Common variants in *FAN1*, located in 15q13.3, confer risk for schizophrenia and bipolar disorder in Han Chinese [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2020, 103: 109973.
- [27] GREEN E K, REES E, WALTERS J T, et al. Copy number variation in bipolar disorder [J]. Mol Psychiatry, 2016, 21(1): 89-93.
- [28] KIROV G. The role of copy number variation in schizophrenia[J]. Expert Rev Neurother, 2010, 10(1): 25-32.
- [收稿日期:2024-03-09]
- [责任编辑:涂剑,向秋 英文编辑:周寿红]