

智力障碍患者 *POGZ* 基因突变分析

李颖¹, 林欣怡¹, 刘传勇², 蒋嵩山³, 宋新明¹, 陈争¹

(1. 中山大学中山医学院医学遗传教研室, 广东 广州 510080; 2. 茂名市人民医院, 广东 茂名 525000;
3. 中山大学生命科学院, 广东 广州 510006)

摘要:【目的】在100名智力障碍患者中筛查基因 *POGZ* 的突变, 探索 *POGZ* 的突变与智力障碍的关系。【方法】提取患者外周血 DNA, 对 *POGZ* 的外显子、外显子-内含子接头区以及 5' UTR 区、3' UTR 区进行 PCR-测序分析。通过与数据库中数据进行比对, 查找突变位点。【结果】在100名智力障碍患者中检测出一例未报道过的新错义突变 c.2498 G>A, p.H833R。该突变破坏了 *POGZ* 蛋白上与 HP1 结合起关键作用的 C2H2 锌指结构, 可能使 *POGZ* 无法与 HP1 蛋白结合进而影响其调控细胞周期的功能。【结论】*POGZ* 基因的突变是引起先天性智力障碍的原因之一。对不明原因智力障碍的患者做 *POGZ* 的筛查有助于进一步明确病因, 对有智力障碍家族史的孕妇做产前检查能防止患儿的出生。

关键词: *POGZ*; 智力障碍; 新突变

中图分类号: R394.3 文章标志码: A 文章编号: 1672-3554(2017)06-827-06

A Novel *POGZ* Mutation in a Patient with Intellectual Disability

LI Ying¹, LIN Xin-yi¹, LIU Chuan-yong², JIANG Song-shan³, SONG Xing-ming¹, CHEN Zhen¹

(1. Department of Medical Genetics, Zhongshan School of Medicine, SunYat-Sen University, Guangzhou 510080, China;
2. Guangdong Maoming City People's Hospital, Maoming 525000, China; 3. School Of Life Sciences, SunYat-Sen University,
Guangzhou 510006, China)

Corresponding to: CHEN Zhen, E-mail: chenzh@mail.sysu.edu.cn

Abstract:【Objective】Screening mutation sites of *POGZ* gene in 100 intellectual disability patients to explore their pathogenesis relationship.【Method】Genomic DNA was isolated from peripheral blood. All exons, exon-intron boundaries, 5' UTR and 3' UTR of *POGZ* were amplified by PCR and PCR products were directly sequenced.【Results】A novel mutation was identified, and the missense mutation disrupted the unique zing-finger like motif of *POGZ*, which is a critical element for binding Hp1. The mutated *POGZ* failed to bind with HP1 thus might lose its cell cycle regulation function.【Conclusion】Mutations of *POGZ* gene weighs more in intellectual disability etiology. Screening of *POGZ* in unexplained intellectual disability patients contributes to their pathogenesis analyze, screening of *POGZ* in pregnants with family history of intellectual disability can prevent intellectual disability from birthing.

Key words: *POGZ*; intellectual disability; de novo mutation

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(6): 827-832]

智力障碍(intellectual disability, ID), 又称智力低下或精神发育迟滞, 在新生儿中的发病率约为1%~3%, 男性患者多于女性。智力障碍病因复杂, 除由围产期异常、染色体异常、先天性代谢缺陷等已知病因外, 仍有约55%~60%的智力低下病因不明^[1]。遗传因素是研究不明原因的智力低下

的关键, 其致病基因的定位是近年来智力障碍研究的核心。2015年中山大学中山医学院医学遗传教研室在对一例平衡易位智力障碍患者做断裂点定位时发现其1号染色体断裂点在第一个内含子区域切切断了 *POGZ* 基因, 由此我们猜测智力障碍可能与该基因有关并查阅了相关文献。

收稿日期: 2017-06-28

基金项目: 国家自然科学基金(30971601)

作者简介: 李颖, 硕士研究生, 研究方向: 细胞与分子遗传学, E-mail: liying73@foxmail.com; 陈争, 通信作者, 教授, 硕士生导师, E-mail: chenzh@mail.sysu.edu.cn

Gilissen 等^[2]对 50 名严重智力障碍患者做全外显子分析报道过一例 *POGZ* 的无义突变, Tan 等^[3]在 764 个智力障碍病人中检测到一例 *POGZ* 插入突变, Stessman^[4]从 2 413 个智力障碍病人中筛查出了 12 例 *POGZ* 突变病例。*POGZ* 已列入智力低下的候选基因^[5]。然而,关于 *POGZ* 的报道和研究主要集中在功能丧失性的突变,即拷贝数变异,插入引起的移码突变以及引入终止密码子和影响剪切位点的点突变,对 *POGZ* 单个氨基酸的错义突变报道和研究相对较少。与功能丧失性突变相比,错义突变的 *POGZ* 仍保留部分功能,错义突变是否也会引起智力低下,缺失的结构域不同对智力低下的形成是否有不同的影响,哪一部分结构域更为关键,这些具体的突变致病机制我们仍不清楚。本研究对 100 名 ID 患者 *POGZ* 基因进行测序,探索 *POGZ* 突变与智力障碍的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

突变筛查对象:筛选具有相似临床症状的并排除其中由围产期异常、染色体异常、先天性代谢缺陷等所致不明原因非综合征型智力障碍患者一共 100 例,各患者无智力障碍家族史,无近亲结婚史。其中男 49 例,女 51 例,平均年龄 8.9 岁。患者血液标本主要为 2014 年 9 月至 2016 年 9 月来本实验室检查的患者,部分由广州市妇婴医院、广州市计划生育研究所、茂名市人民医院提供,患者均签署了知情同意书。另外,收集同期医院门诊体检正常人标本 100 例做正常对照,其各项生理指标及智力均正常,男 50 例,女 50 例,平均年龄 9.1 岁,各取静脉血 2 mL。新突变病人病历资料:女,26 岁,非近亲家庭足月顺产,出生时无窒息、无核黄疸、无高热抽搐史。1 岁能走路,发“爸”“妈”等简单音。之后智力发育迟缓,现仍只能表达简单语言,做简单事,与人说话少,发音含糊。读书至小学,成绩极差,现仍只能计算“1+1”。无智力障碍家族史。

1.2 实验方法

取病人和正常对照外周肝素静脉抗凝血 200 μ L,用天根血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒制备基因组 DNA。登陆网站 www.ncbi.nlm.nih.gov 下载人类 *POGZ* 基因序列,以 NM_015100.3 为

参考序列,对 *POGZ* 基因的 5' UTR 区、外显子、外显子-内含子接头区以及 3' UTR 区用 Primer Premier 5.0 设计 PCR 引物,再以 Oligo 6.0 对引物进行评价。通过预实验探索扩增体系保证引物扩增目的片段可得到清晰的测序结果。具体扩增引物,引物名称、序列及退火温度见表 1。引物均由北京华大基因公司合成。由于引物长短、扩增片段 GC 含量的差异,各对引物的最优扩增条件不一致,根据使用的扩增酶不同可分为两种体系:① TAKARA *Taq* 酶 PCR 普通扩增体系;② TAKARA LA *Taq* 酶高 GC 含量扩增体系。将 PCR 产物交由北京华大基因公司(BGI)采用 ABI PRISM 3730 测序仪 sanger 测序。测序结果与 UCSC 数据库序列进行比对分析,对未报道的错义突变,使用 PolyPhen-2 对其有害性进行分析,预测该突变是否对蛋白质的二级结构产生了影响。

2 结果

2.1 测序结果

通过对 100 名智力障碍病人 *POGZ* 基因筛查,在一例病人中检测到新的突变位点 c.2498 G>A, p.H833R,位于 *POGZ* 基因 17 号外显子(图 1)。在 100 例正常对照中未发现相同突变。

2.2 新突变引起的氨基酸改变

该患者的突变碱基使 *POGZ* 蛋白第 833 位氨基酸由组氨酸(His)变成了精氨酸(Lys),经软件 PloyPhen-2 的预测为有害突变。进一步分析 *POGZ* 蛋白结构后,该突变定位在 *POGZ* 蛋白分子 HPZ 蛋白结合结构域内(图 2)。

3 讨论

3.1 *POGZ* 结构与功能

POGZ 基因(pogo transposable element derived with ZNF domain)是锌指蛋白家族的一员,定位于染色体 1q21.3,编码锌指蛋白。在 NCBI 及 UCSC 可查到 *POGZ* 基因有 5 种剪接方式,形成 5 种异构体,各异构体在人体不同的组织中分布不同,基因型-组织表达(Genotype-Tissue Expression, GTEx)研究联盟(GTEx Consortium)发布的数据显示:在人体各不同组织中,*POGZ* 的 isoform2 和 isoform3 在的表达远都远高于其他几个异构体,以小脑和

表1 POGZ基因Isoform1的测序引物
Table 1 Summary of primers data of POGZ isoform1

Extron	Primer sequence(5'→3')		Annealing temperature/°C
	Forward	Reverse	
1	AAGTGACGAGCCGTATCCCT	CGAGCGAAAAGATAACGGAAC	59
2	AGGAGTCCAAGGAGGTAGGTTT	CCAACCTTCCAATGTTTTTCG	58
3	TAACCAGGAGATGCGAGACGAAG	TCTACAGAAATCACTTCCGTATCAG	58
4	TCCCCTACCCATCTGTTTTTC	CTAATGACGCCAAAGACCCTA	58
5	GAGCCAGTCTGTTGATGAGGTT	TTTACTACTTGATGAAGGGTGGTG	58
6	ATACTCCTCTTGAAACCTCTGAT	GCCACTTCAATTGCTATTTTTCG	58
7	CAGTCAAACCAGACCACGAA	AAACCTTGCTCAGAAATCCATC	58
8	AGAGTTAGAACAGTAAAAGGAAGCC	ATTTTAGAGCCCCTGCTTACA	56
9	GAGAATACCTGAAACCAAACCG	GGAGACATACTGCTTTCCTTAC	57
10	GAGGGGAGCAGATAATGTTTG	TTCTGAATCAACGCCCTA	56
11	AAACAGTGGTAAGACAGGAGGAT	TGGAAACCTGAAGATAAACTGT	57
12	CACAAACATAGCCCAGCATT	GAATATGGGAATTGCTTGGTG	56
13-14	TTATCAACAGAAAGGTGGGAAG	TCAGACAACAAACCCTGCTAAA	57
15-1	ACAGTGCAATCTGGTAGCTTTTTA	GAAGGAGGAAACATATTAGAAGCAG	58
15-2	CATGCCTGGAGTGCAGCTTC	GATCATGTGGTTGGCATAAG	58
16-17	GGCTTAGGTTGAGATTAGGGTG	AGGTCCAGCACATCTCAACAG	58
18	GGTCACTGCGAACAGCGTA	GCAGTTGAGGCTGGTGATG	58
19-1	GCTCACTCAAGGTAACAAAACTC	TGGGGATTTCCGGAAGTGT	57
19-2	TGCCACTGTGAAATCTGCG	AACGCACAGCCCCTCATAG	58
19-3	GAACACTTCCGAAATCCCC	CATCTGCCCTCTGTAGAAAACC	56
19-4	TCCTATGAGTGGGCTGTGC	TCTGACAAGTGAGTGGATGA	57
19-5	GGCAGATGGCACTGTCCCT	ATCTGGGTCTGGAGTGGA	58
19-6	TGTGATTCTGATGTCTGCTTC	CCCCAACACTCAAATCTCCA	58
20-1	GTGGGGAACATTCTGAGTCTT	TTGAGGTAAGGGGAAACA	56
20-2	TGTTTTCCCTTTTACCTCAA	TGAAGACTCAAACCTGGGAATG	55
20-3	CAACACCATCCATCCCTCTG	AAGCCTCAGGATAAACAGAAGAC	58
20-4	TGTGGCTTTCCCTATTTCT	AGATGTCAAAGGTTACAAAGC	56

垂体中的表达量最高。从人脑的整个发育过程看,1岁以前POGZ的表达量远远高于1岁以后;1岁以后至30岁之间脑组织内的POGZ表达较低且差异不大;30~40岁之间,脑组织内的POGZ会出现一次明显升高之后降低。POGZ在人类脑组织的发育过程中呈现出的表达变化趋势很可能与神经系统的发育过程相关^[6]。POGZ的突变可以通过对神经系统的发育过程的影响而导致智力障碍。

POGZ蛋白分子由一个HP1蛋白结合结构域(HPZ),一个CENP-B DNA结合域,一个DDE结构

域,以及一个由9个C2H2结构组成的锌指结构簇组成。其中,C2H2是经典的锌指蛋白,与锌离子结合维持POGZ空间结构稳定性(图2)。

锌指蛋白是人类蛋白质组中的一个庞大的蛋白质家族,与其靶分子DNA、RNA、DNA-RNA序列特异性结合,在转录和翻译水平调节基因的表达。在细胞分化、胚胎发育、增强植物抗性方面起重要的作用。近年来筛查出的智力障碍相关蛋白中,锌指蛋白并不少见,如ZNF148^[7]、ZNF527^[8]、ZC3H14^[9]等。2013年我实验室通过染色体平衡易位断裂点分子定位及智力障碍患者突变筛查新

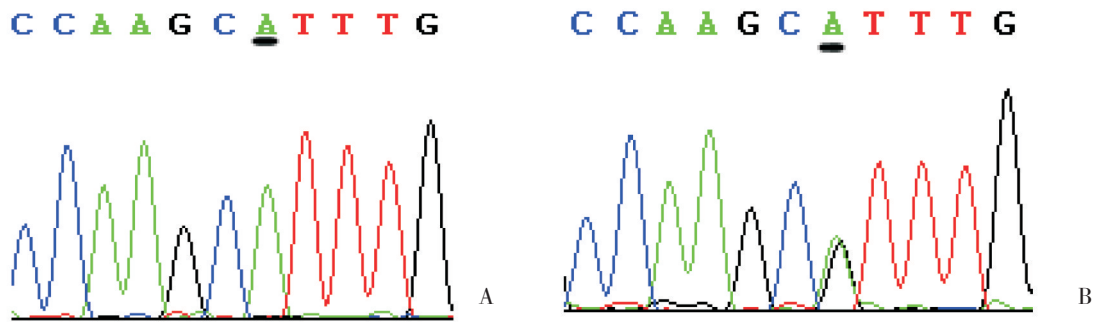
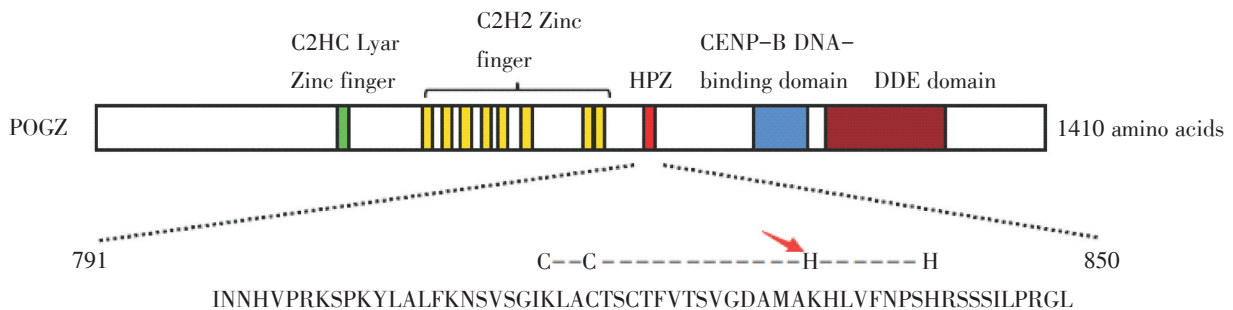


图1 正常人(A)和患者(B)的c.2498位点测序图

Fig.1 Electropherograms of normal control(A) and patient(B)



The structure of *POGZ* is shown, with Zinc-finger motifs (green and yellow), HPZ motif (red), CENP-B DNA-binding domain (blue) and DDE domain (brown). The amino acid sequence of *POGZ* 791 to 850 contain a C2H2 Zinc finger-like motif with irregular six amino acid insertion between His833-His840, which is essential for interaction with HP1. The novel missense mutation of HIS833 abolished the interaction with HP1.

图2 POGZ 蛋白结构图

Fig.2 Schematic overview of the POGZ protein

发现的智低致病基因 ZNF407 也属于锌指蛋白家族^[10]。锌指蛋白家族在智力障碍候选基因中的重复出现说明锌指结构的异常对于智力障碍的形成有一定的影响,

CENP-B DNA 结合域能与 DNA 分子结合。该结构域的变异会致 POGZ 蛋白分子结合 DNA 的能力下降,该结构域的缺失则使 POGZ 分子失去结合 DNA 分子的能力^[11]。然而该区域与 DNA 结合后会如何进一步调控细胞功能目前尚缺少具体的研究。值得注意的是智力障碍病人中曾报道过在结构域内的突变^[12]。

POGZ 的 DDE 结构域内含转座酶催化中心,属于转座酶,催化 DNA 分子的断裂和重组,其具体的细胞功能尚不明确,目前 DDE 结构域的研究提示其可能是抗 HIV-1 病毒感染的新研究靶点之一^[13]。

HPZ 是 POGZ 蛋白与 HP1 分子结合的结构域,对 POGZ 功能的探索离不开对 HP1 分子功能的讨论。HP1 蛋白属于异染色质体的一部分,主要有两类功能:一是通过形成异染色体使基因沉默从而调控基因的表达。HP1 分子与染色质的结合和解离影响染色质的凝集程度,异染色质的形成与维持过程都需要 HP1 分子的参与;二是参与细胞周期,在细胞分裂间期,HP1 分子通过 H3S10 结合到染色体上。进入分离前期,激活的 Aurora Kinase B 分子使 H3S10 磷酸化为 H3K9,后者不能结合 HP1 从而使 HP1 从染色体上解离,HP1 分子在细胞周期中与染色体先结合后脱离影响着染色体的聚集和分离。POGZ 分子能与 HP1 结合并激活 Aurora Kinase B,对 HP1 从染色体臂的释放,CPC 的招募,微管与动点的正确连接都有调控作用。*POGZ* 基因敲除的 HELA 细胞分裂前期染色体能

够正常浓缩,中后期染色体的集中和姐妹染色单体的分离则出现明显异常。总之,HPZ是POGZ参与调控细胞分裂过程的主要功能域,POGZ通过该结构域调控细胞周期。

3.2 POGZ突变与疾病

本次研究中筛查到新突变是点突变导致POGZ基因HPZ结构域改变的首次报道,突变使POGZ蛋白第833位氨基酸由组氨酸(His)变成了精氨酸(Lys)。HP1与大部分HP结合蛋白的结合是通过识别结合结构域PxVxL(x为任意氨基酸),然而POGZ与HP1的结合并非通过此结构。XX等用酵母双杂交系统分析出POGZ分子通过其HPZ结构域内Ile 791 - Leu 850的氨基酸序列与HP1结合,其中由2个半胱氨酸(Cys)和2个组氨酸(His)组成C2H2锌指结构是结合的关键(图2)。2010年Nozawa等^[14]用酵母双杂交实验研究POGZ功能时证明这4个氨基酸中任何一个单独突变都会切断POGZ与HP1的结合。患者的新突变恰好破坏了该区域的C2H2结构将使POGZ无法识别结合HP1。POGZ与HP1的结合是POGZ参与调节细胞周期的始动因素,POGZ调节的缺失可能引起细胞周期的异常。如前文所述,POGZ在人体内主要集中表达于脑组织,当异常的POGZ蛋白在脑组织神经元内大量出现时,很有可能通过改变细胞周期影响神经元细胞的增殖而成为引起智力障碍的原因。

截至2017年6月,各类有智力障碍症状的临床综合征中报道的智力障碍致病基因不少于700个,与智力障碍相关基因总数高达2000多个。由于多数与智力低下相关基因的突变率较低,而且本次研究样本量不是很大,只发现一例破坏了POGZ的关键结构的错义突变,Stessman^[4]从2413个智力障碍病人中也只筛查出了12例POGZ突变病例,但也不能排除我们发现的这一例突变是偶然出现的可能。此外,本次研究未对患者做全外显子测序,不能排除该病人尚存在其他基因突变的可能。然而,智力障碍的形成与多个基因有关。对智力障碍患者做全外显子测序,检测到的突变往往不止一个,可能涉及多个基因,并且这些基因之间可能存在相互作用和联系。在这样一个复杂的分子网络中,智力障碍患者的临床表现及其严重程度与突变之间的关系并不是简单的叠加或正比。单独用某个基因的突变来完全解释智力

低下的形成是不合理的。不同基因不同的突变对智力低下的形成有不同的贡献度,如何评估并比较各基因对智力低下的重要性仍是未解难题。面对这样的困境,对突变率低的相关基因应增加样本进行进一步研究,筛选出致病基因的潜在致病位点并应用于临床诊断,在产前诊断中也应考虑加入这些位点的筛查,有助于提高智力障碍患儿的检出率。

除了智力障碍,POGZ的突变也出现在其他发育障碍性的疾病:Ivan等^[15]对343例ASD患者做全外显子测序发现了一例POGZ插入突变,Benjamin等^[16]在175例ASD患者中也筛查出一例POGZ插入突变,Fromer等^[17]在623名精神分裂患者中报道过一例POGZ的缺失突变,此外,先天性心脏病(congenital heart disease, CHD)^[18],神经退化性疾病(neurodevelopmental disorders, NDD)^[19-20]等疾病中也曾出现POGZ的突变。这些疾病大多与神经系统的异常有关,遗传因素是其病因的关键,且一种疾病往往能检测出多种蛋白分子基因的异常。分析这些疾病中突变的分子,找出其重合的异常基因有利于探索更加本质性的致病机制。POGZ的突变重复出现在这些疾病中,无疑是这些疾病突变基因中的重合基因之一,对POGZ的进一步研究也是对这些疾病病因的研究,将为这些疾病提供新的诊断和治疗靶点。

3.3 结论

ID患者不仅表现为智力低下,也影响患者的社会和情感认知能力,伴有不同程度孤独症状和脏器畸形,导致其学习困难、缺乏生活和劳动能力。患者的出生给其家庭和社会带来严重的精神压力和经济负担。ID的高发病率和致残率已成为制约社会和经济发展的因素之一。探查该病的发病原因、对患者进行病因诊断,并以此为依据对高危产妇进行产前诊断,从而减少患儿的出生是减低该病发病率的有效措施,对于缓解此病所带来的社会压力有重要的意义。本次报道的新突变破坏了POGZ的关键结构,在100例正常对照中未出现相同突变,其导致智力障碍形成的可能性很大。

参考文献

- [1] Topper S, Ober C, Das S. Exome sequencing and the genetics of intellectual disability[J]. Clin Genet, 2011,

- 80(2):117-126.
- [2] Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT, et al. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability[J]. *Nature*, 2014, 511(7509): 344-347.
- [3] Tan B, Zou Y, Zhang Y, et al. A novel de novo POGZ mutation in a patient with intellectual disability [J]. *J Hum Genet*, 2016, 61(4): 357-359.
- [4] Stessman HA, Willemsen MH, Fenckova M, et al. Disruption of *POGZ* is associated with intellectual disability and autism spectrum disorders [J]. *Am J Hum Genet*, 2016, 98(3): 541-552.
- [5] Fitzgerald TW, Gerety SS, Jones WD, et al. Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders [J]. *Nature*, 2015, 519(7542): 223-228.
- [6] Human genomics. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: Multitissue gene regulation in humans [J]. *Science*, 2015, 348(6235): 648-660.
- [7] Stevens SJ, van Essen AJ, van Ravenswaaij CM, et al. Truncating de novo mutations in the Kruppel-type zinc-finger gene *ZNF148* in patients with corpus callosum defects, developmental delay, short stature, and dysmorphisms [J]. *Genome Med*, 2016, 8(1): 131.
- [8] Gulkovskiy RV, Chernushyn SY, Kravchenko SA, et al. *ZNF527* GENE rs386809049 analysis in population of Ukraine [J]. *Tsitologiya*, 2015, 49(4): 35-39.
- [9] Kelly S, Pak C, Garshasbi M, et al. New kid on the ID block: Neural functions of the Nab2/ZC3H14 class of Cys(3) His tandem zinc-finger polyadenosine RNA binding proteins [J]. *RNA Biol*, 2012, 9(5): 555-562.
- [10] Ren CM, Liang Y, Wei F, et al. Balanced translocation t(3;18)(p13;q22.3) and point mutation in the *ZNF407* gene detected in patients with both moderate non-syndromic intellectual disability and autism [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1832(3): 431-438.
- [11] Masumoto H, Masukata H, Muro Y, et al. A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite [J]. *J Cell Biol*, 1989, 109(5): 1963-1973.
- [12] Matsumura K, Nakazawa T, Nagayasu K, et al. De novo POGZ mutations in sporadic autism disrupt the DNA-binding activity of *POGZ* [J]. *J Mol Psychiatry*, 2016, 4: 1.
- [13] Bartholomeeusen K, Christ F, Hendrix J, et al. Lens epithelium-derived growth factor/p75 interacts with the transposase-derived DDE domain of *PogZ* [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(17): 11467-11477.
- [14] Nozawa RS, Nagao K, Masuda HT, et al. Human *POGZ* modulates dissociation of HP1alpha from mitotic chromosome arms through Aurora B activation [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(7): 719-727.
- [15] Iossifov I, Ronemus M, Levy D, et al. De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum [J]. *Neuron*, 2012, 74(2): 285-299.
- [16] Neale BM, Kou Y, Liu L, et al. Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders [J]. *Nature*, 2012, 485(7397): 242-245.
- [17] Fromer M, Pocklington AJ, Kavanagh DH, et al. De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks [J]. *Nature*, 2014, 506(7487): 179-184.
- [18] Homsy J, Zaidi S, Shen Y, et al. De novo mutations in congenital heart disease with neurodevelopmental and other congenital anomalies [J]. *Science*, 2015, 350(6265): 1262-1266.
- [19] White J, Beck CR, Harel T, et al. *POGZ* truncating alleles cause syndromic intellectual disability [J]. *Genome Med*, 2016, 8(1): 3.
- [20] Ye Y, Cho MT, Retterer K, et al. De novo *POGZ* mutations are associated with neurodevelopmental disorders and microcephaly [J]. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*, 2015, 1(1): a000455.

(编辑 徐杰)