

论著·临床研究

家系全外显子组测序鉴定 Wolfram 综合征致病突变及其临床性状分析

孟祥雨¹, 闫丹丹², 陈香慧², 赖思宇², 徐云¹, 耿瑞娜¹, 张红², 张蓉², 胡承², 严婧²

1. 新乡医学院第一附属医院内分泌科, 新乡 453100; 2. 上海交通大学医学院附属第六人民医院内分泌代谢科, 上海市糖尿病临床医学中心, 上海市糖尿病重点实验室, 上海市糖尿病研究所, 上海 200233

[摘要] **目的**·拟鉴定一个可疑 Wolfram 综合征的中国糖尿病家系的致病基因和突变位点, 并进行相关临床性状分析。**方法**·纳入糖尿病家系共 12 名成员。先证者于 2013 年 5 月到新乡医学院第一附属医院内分泌科初诊, 并于 2022 年 7 月和 2023 年 4 月先后 2 次来院复诊; 该家系其他成员分别为先证者的姐姐、父亲、母亲、祖父、祖母、伯伯、姑姑及外祖父、外祖母、大舅和小舅。收集研究对象的临床资料。利用全外显子组测序对该家系 6 名成员的致病基因及其突变位点进行筛查, 并用 Sanger 测序进行验证; 采用 CADD、DANN、MetaSVM、Polyphen-2、SIFT 和 M-CAP 生物信息学软件预测 Wolfram 综合征致病基因 *WFS1* 突变对其编码蛋白 wolframin 结构和功能的影响; 使用 Swiss-Model 软件构建野生型和突变型 wolframin 蛋白的三维结构, 并用 PyMOL 软件进行可视化; 用 Clustal Omega 软件进行 *WFS1* 基因突变位点物种保守性估测; 采用 JNetPred 软件进行 wolframin 蛋白二级结构在线预测。**结果**·该家系中, 先证者及先证者的姐姐均携带 Wolfram 综合征致病基因 *WFS1* 的复合杂合突变 R558H 和 S411Cfs*131; 先证者的父亲和祖父均携带 R558H 突变; 先证者的母亲和外祖父均携带 S411Cfs*131 突变。R558H 为罕见错义突变, 而 S411Cfs*131 是一个尚未报道过的移码突变。生物信息学分析提示 R558H 位于 wolframin 蛋白 α 螺旋结构域上, 为损害突变, 且该突变区域的氨基酸序列在包括人类在内的 12 个进化程度不同的物种间具有较高的保守性。**结论**·利用家系全外显子组测序鉴定出 Wolfram 综合征的 2 个致病突变, 可对 Wolfram 综合征现有基因型和表型谱进行补充, 实现对糖尿病家系的早期诊断, 并有助于对患者及时开展随访, 以实现疾病的早期干预和治疗。

[关键词] 全外显子组测序; Wolfram 综合征; 糖尿病家系; 致病突变

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2023.07.012 **[中图分类号]** R446.9 **[文献标志码]** A

Identification of pathogenic mutations for a Wolfram syndrome pedigree by whole exome sequencing and analysis of its clinical characteristics

MENG Xiangyu¹, YAN Dandan², CHEN Xianghui², LAI Siyu², XU Yun¹, GENG Ruina¹, ZHANG Hong², ZHANG Rong², HU Cheng², YAN Jing²

1. Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453100, China; 2. Department of Endocrinology and Metabolism, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; Shanghai Clinical Centre for Diabetes; Shanghai Key Laboratory of Diabetes Mellitus; Shanghai Diabetes Institute, Shanghai 200233, China

[Abstract] **Objective**·To identify the causative gene and mutations and describe the clinical traits in a Chinese diabetes pedigree suspected of Wolfram syndrome. **Methods**·A total of 12 subjects from one family were included. The proband was admitted to the Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, for the first time in May 2013. Then he visited the hospital for follow-up in July 2022 and in April 2023, respectively. The other members of this family included the proband's sister, father, mother, paternal grandfather, paternal grandmother, uncle, aunt, as well as maternal grandfather, maternal grandmother, and two brothers of the proband's mother. Clinical data of all subjects were collected. The whole exome sequencing was used to screen the pathogenic genes and mutation sites of six members of the family, and Sanger sequencing was used to verify

[基金项目] 上海交通大学医学院附属第六人民医院面上培育项目 (Ynms202109); 上海市内分泌代谢疾病研究中心 (2022ZZ01002)。

[作者简介] 孟祥雨 (1988—), 男, 主治医师, 硕士; 电子信箱: mengxiangyu@126.com。

[通信作者] 严婧, 电子信箱: jingyan_1216@vip.163.com。

[Funding Information] General Cultivation Project of Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (Ynms202109); Shanghai Research Center for Endocrine and Metabolic Diseases (2022ZZ01002).

[Corresponding Author] YAN Jing, E-mail: jingyan_1216@vip.163.com.

the above results. Effects of the mutation of the pathogenic gene *WFS1* in Wolfram syndrome on the function of the wolframin protein were evaluated by bioinformatics softwares, including CADD, DANN, MetaSVM, Polyphen-2, SIFT and M-CAP. The three-dimensional structures of wild-type and mutant wolframin proteins were constructed with Swiss-Model software, and visualized with PyMOL software. Cluster Omega software was used for evaluating species conservation of *WFS1* gene mutation sites. JNetPRED software was used for online prediction of wolframin protein secondary structure. **Results**·The proband and his sister both carried R558H and S411Cfs*131 mutations, two compound heterozygous mutations of the Wolfram syndrome pathogenic gene *WFS1*. The proband's father and parental grandfather both carried the R558H mutation, while the proband's mother and maternal grandfather both carried the S411Cfs*131 mutation. The R558H mutation was a rare missense mutation, and the S411Cfs*131 mutation was a novel frameshift mutation. Bioinformatics analysis softwares predicted that the R558H mutation located in the α -helical structure of the wolframin protein. This mutation was a damage mutation and the amino acid sequence of the mutation region was highly conservative among 12 species with varying degrees of evolution, including humans. **Conclusion**·Two causative mutations of *WFS1* gene are identified in a Chinese diabetes pedigree by whole exome sequencing. The study supplements the existing genotype and phenotype profiles of Wolfram syndrome, which can realize early diagnosis of diabetes pedigrees and help in performing timely follow-up of patients, so as to achieve early intervention and treatment of this disease.

[Key words] whole exome sequencing; Wolfram syndrome; diabetes pedigree; causative mutation

全外显子组测序技术是指利用目标序列捕获技术将基因组的全部外显子区域 DNA 捕获后进行高通量测序的基因组分析方法。全基因组外显子序列在人类基因组序列中只占 1%~2%，却与个体表型相关的大部分功能性变异有关，与 85% 导致人类疾病的基因突变相关^[1-3]。目前，全外显子组测序已经在单基因病、癌症及复杂疾病等的致病基因和易感基因的定位中得到成功应用^[2,4-5]。其中，在散发糖尿病和糖尿病家系中应用全外显子组测序可高效找到单基因糖尿病（如新生儿糖尿病、线粒体糖尿病）及伴糖尿病的遗传综合征的致病基因，对糖尿病的遗传诊断和治疗具有重要意义。

遗传综合征是指由基因组或基因结构变化引起的个体器官组织发育、代谢及功能缺陷所致的多种临床表现的组合情况，主要以常染色体显性遗传、常染色体隐性遗传和 X 连锁伴性遗传 3 种孟德尔传递方式遗传。其中，Wolfram 综合征是以糖尿病、视神经萎缩、尿崩症及神经性耳聋为主要特征的一种常染色体隐性遗传综合征；个体携带 2 个功能丧失性突变等位基因可发病，即患者的突变可为纯合子或复合突变杂合子。目前已发现 Wolfram 综合征致病基因 *WFS1* 的 200 多种突变，散在于 *WFS1* 基因编码区^[6-7]。Wolfram 综合征在基因型和临床表型上具有高度异质性，复杂的基因型-表型相关性给该疾病的诊断带来了一定的困难。

为此，本研究采用家系全外显子组测序这一遗传性疾病诊断的重要手段，鉴定一个可疑 Wolfram 综合征的中国糖尿病家系的致病基因和突变位点，并进行

相关临床性状分析，期冀为 Wolfram 综合征患者的早期诊断、早期干预及治疗提供参考。

1 对象与方法

1.1 研究对象

本研究对象为一个可疑 Wolfram 综合征的中国糖尿病家系，共 12 名成员。其中，先证者于 2013 年 5 月到新乡医学院第一附属医院内分泌科初诊，并于 2022 年 7 月和 2023 年 4 月共 2 次至该医院复诊；该家系其他成员分别为先证者的姐姐、父亲、母亲、祖父、祖母、伯伯、姑姑，及其外祖父、外祖母、大舅和小舅。收集该家系成员的临床资料。

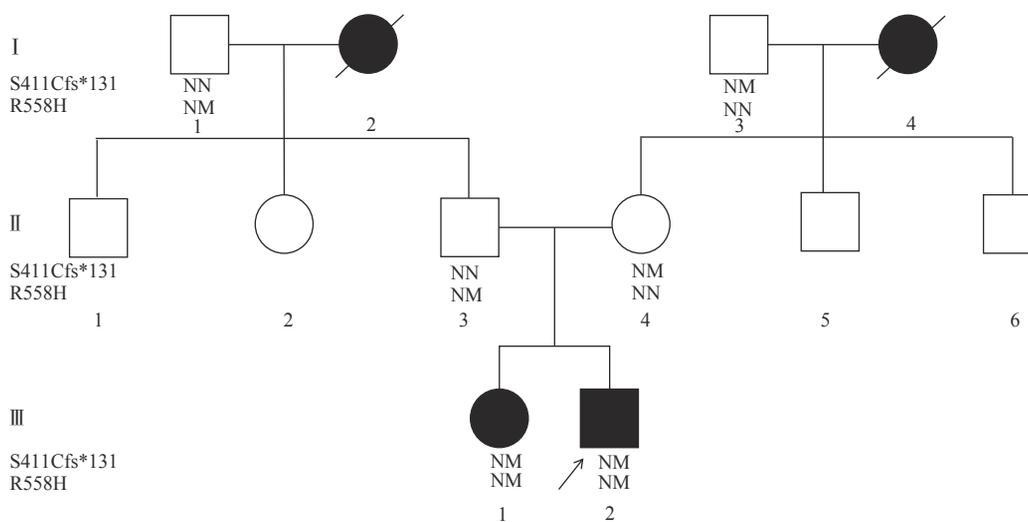
1.1.1 先证者的情况 先证者（Ⅲ₂）（图 1），男性，18 岁。2013 年无明显诱因出现夜尿增多，每晚排尿 5~6 次，量较多。患者无口干、多饮、多食、体质量下降，无尿急、尿痛、排尿不尽感和血尿。空腹血糖 16.57 mmol/L，静脉随机血糖 20 mmol/L，尿糖 ++，血酮体 0.7 mmol/L，谷氨酸脱羧酶抗体（glutamic acid decarboxylase antibody, GADA）和蛋白酪氨酸磷酸化酶抗体（tyrosine phosphatase-like protein antibody, IA-2A）阴性，空腹 C 肽 0.85 ng/mL，被诊断为糖尿病。予重组人胰岛素注射液于早（4 IU）、中（4 IU）、晚（5 IU）餐前 0.5 h 皮下注射，精蛋白重组人胰岛素注射液 4 IU 于睡前皮下注射。近年来因血糖波动，院外多次遵医嘱调整胰岛素降糖方案。2022 年 7 月因四肢无力伴麻木就诊，入院完善检查。入院体格检查：身高 176 cm，体质量

64 kg, 体质量指数 (body mass index, BMI) 20.66 kg/m²。询问出生养育史: 患者足月顺产, 出生时体质量 3.1 kg, Apgar 评分 10 分, 新生儿期健康; 予母乳喂养至 12 月龄, 6 月龄开始添加辅食; 3 月龄时会抬头, 6 月龄时会坐, 1 岁会走; 身高发育与同龄儿相当, 学习成绩优。入院完善辅助检查, 静脉空腹血糖 16.63 mmol/L, 餐后 2 h 血糖 23.31 mmol/L, 糖化血红蛋白 8.2%, 血空腹 C 肽 0.68 ng/mL, 餐后 2 h C 肽 1.07 ng/mL, GADA 和 IA-2A 均阴性。尿微量白蛋白 18.6 mg/L, 尿糖+++ , 尿酮体阴性, 尿比重 1.020。肝肾功能、甲状腺功能正常, 电解质、促肾上腺皮质激素、皮质醇及睾酮正常。B 超提示膀胱残余尿。于 2023 年 4 月再次入院进行检查: 眼底检查提示杯盘比 (cup-disc ratio, C/D) >0.5, 视神经呈苍白色、色淡; 光学相干断层扫描 (optical coherence tomography, OCT) 发现左眼视网膜神经纤维层 (retinal nerve fiber layer, RNFL) 鼻侧超薄, 右眼 RNFL 普遍超薄, 提示双眼视神经萎缩; 双侧眼球无震颤, 无耳聋。入院后根据临床表现诊断为糖尿病、糖尿病周围神经病变、神经源性膀胱。予门冬胰岛素注射液于早 (6 IU)、中 (6 IU)、晚 (11 IU) 餐前 5 min 皮下注射, 甘精胰岛素注射液 26 IU 于睡前皮下注射, 阿卡波糖 50 mg 每日 3 次口服, 二甲双

胍 0.5 g 每日 1 次口服来控制血糖。

1.1.2 家系其他成员的情况 先证者姐姐 (III₁) (图 1), 女性, 22 岁。2013 年因口干、多饮、多食伴体质量下降 1 个月余就诊。静脉随机血糖为 20 mmol/L, 尿糖++, 尿酮弱阳性, 血酮体 0.7 mmol/L, 空腹 C 肽 0.91 ng/mL。GADA 和 IA-2A 阴性。被诊断为糖尿病, 予重组人胰岛素注射液三餐前皮下注射、精蛋白重组人胰岛素注射液睡前皮下注射控制血糖。院外根据血糖情况遵医嘱调整胰岛素降糖方案。患者 2022 年开始出现双眼视力下降, 左侧为著。于 2023 年 4 月入院进行眼底检查: C/D 增大, 视神经苍白、色淡, 左侧为著, 符合视神经萎缩诊断。体格检查: 身高 161 cm, 体质量 49 kg, BMI 18.91 kg/m²。双侧眼球无震颤, 无耳聋, 双下肢无浮肿, 双足背动脉搏动对称、有力, 足部皮温正常。

先证者的父亲 (II₃) 45 岁, 母亲 (II₄) 48 岁, 伯伯 (II₁) 50 岁, 姑姑 (II₂) 54 岁, 祖父 (I₁) 78 岁, 祖母 (I₂) 73 岁时因脑梗死去世; 先证者的外祖父 (I₃) 83 岁, 大舅 (II₅) 51 岁, 小舅 (II₆) 54 岁, 外祖母 (I₄) 67 岁时因脑梗死去世。以上家系所有亲属中, 除先证者的大舅患有高血压以外, 其他均无糖尿病、高血压、冠状动脉粥样硬化性心脏病 (冠心病)、脑梗死疾病。



Note: M—mutant allele; N—non-mutant allele. S411Cfs*131 is a frameshift mutation; R558H is a missense mutation. Arrow indicates the proband.

图 1 先证者家系图

Fig 1 Family tree of the proband

1.2 研究方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 采集先证者及家系其他 5 位成员的外周血 2 mL (EDTA 抗凝), 用 QIAGEN 血

液 DNA 提取试剂盒 (QIAamp DNA Blood Mini Kit, 51104, QIAGEN 公司, 德国) 抽提其基因组 DNA。

1.2.2 全外显子组测序 使用 KAPA HyperExome 探

针 (Roche 公司, 瑞士) 对外显子组 DNA 进行捕获富集, 用 NovaSeq6000 测序仪 (Illumina 公司, 美国) 进行高通量测序, 并进行生物信息数据分析。使用 GATK BaseRecalibrator 软件 (version 3.7) 对测序数据进行质量评估, 用 Burrows-Wheeler Aligner 软件 (BWA-MEM, version 0.7.17-r1188) 将测序序列比对到人参考基因组 (hg19/GRCh37), 对检测

出的突变位点进行注释。用 Exome Aggregation Consortium (ExAC) 数据库比对检测出的突变位点的频率。

1.2.3 Sanger 测序 PCR 扩增后对产物纯化, 制备测序模板; 在 ABI 3500XL 测序仪 (Applied-Biosystems 公司, 美国) 上进行正反向测序。测序引物序列见表 1。

表 1 测序引物序列

Tab 1 Sequences of the primers

Target mutation	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
R558H	TTGGCCAGACCTTCATCACC	CTCCAGAGACGTGAACCACC
S411Cfs*131	GAGAACTCCGCACCCTCAC	CTGACGTTGAGGACGACCAG

Note: R558H is a missense mutation; S411Cfs*131 is a frameshift mutation.

1.2.4 生物信息学软件分析蛋白结构、功能、物种保守性 用 CADD (combined annotation dependent depletion)、DANN (domain-adversarial training of neural networks)、MetaSVM (meta-support vector machine)、Polyphen-2 (polymorphism phenotyping v2)、SIFT (sorting intolerant from tolerant) 和 M-CAP (Mendelian clinically applicable pathogenicity) 生物信息学软件预测突变位点对蛋白质结构和功能的影响。使用 Swiss-Model 软件构建野生型和突变型 wolframin 蛋白的三维结构, 并用 PyMOL 软件 (version 2.2.0) 进行可视化。用 Clustal Omega 软件 (version 1.2.2) 比对突变位点的物种保守性: 随机选择了包括人类在内的 12 个进化程度不同的物种, 对每个物种的同源蛋白进行比对, 并基于保守值确定变异的致病可能性。采用 JNetPRED 软件进行蛋白二级结构在线预测。

比对, 该错义突变 R558H 在东亚人群中出现的频率为 1/10 000; 而移码突变则为国际上首次发现的新突变。根据《美国医学遗传学与基因组学学会 (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) 遗传变异分类标准与指南》分析, R558H 的致病性证据为 PM2+PM3+PP3+PP4, 提示该变异为可能致病性的变异; S411Cfs*131 的致病性证据为 PM2+PM3+PM4+PP4, 提示该变异为可能致病性的变异。

2 结果

2.1 先证者全外显子组测序结果分析

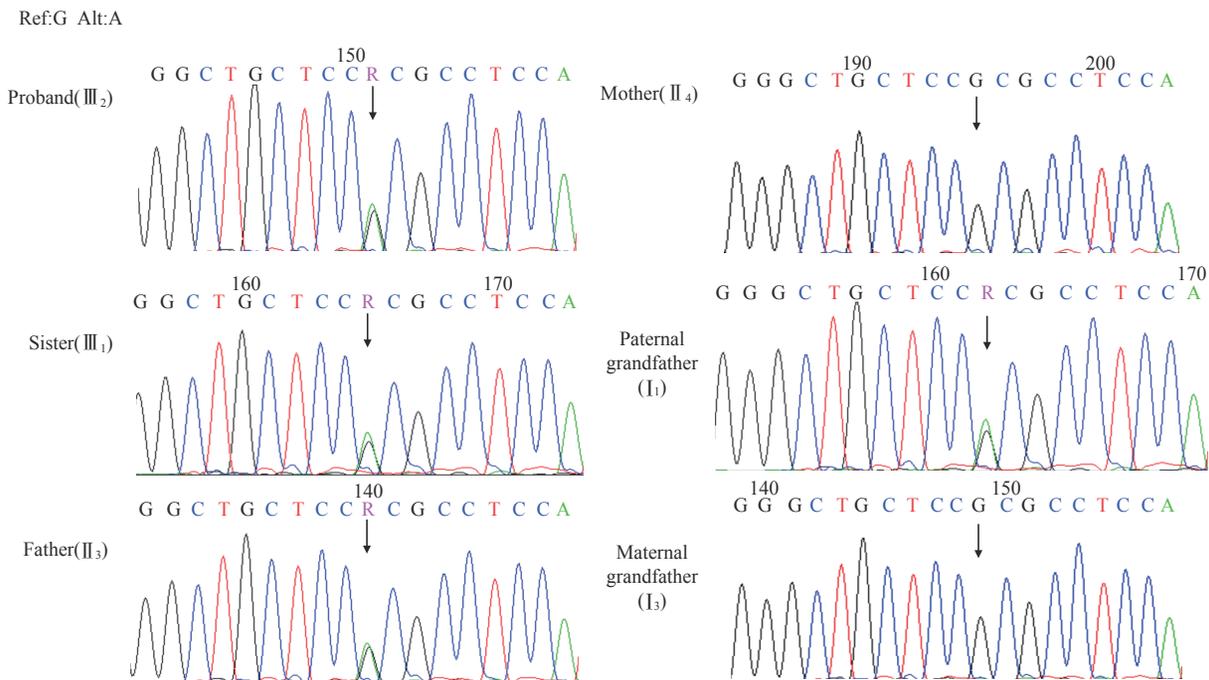
通过全外显子组测序鉴定出先证者携带 *WFS1* 基因的复合杂合突变: 根据人参考基因组 (hg19/GRCh37), 一条染色体 *WFS1* 基因外显子 8 发生了一个错义突变, 即第 1 673 位核苷酸由 G 突变成了 A (c.G1673A), 其翻译的蛋白中精氨酸变成了组氨酸 (p.R558H); 另一条染色体 *WFS1* 基因外显子 8 第 1 228 和 1 229 位核苷酸缺失 (c.1228_1229del), 导致了移码突变 (p.S411Cfs*131)。经与 ExAC 数据库

2.2 家系其他成员测序结果分析

通过全外显子组测序鉴定出先证者的姐姐也同时携带 *WFS1* 基因这 2 个复合杂合突变。其家系成员中, 先证者的父亲和祖父均携带 *WFS1* 基因的 R558H 杂合突变; 先证者的母亲和外祖父则携带 S411Cfs*131 杂合突变。随后用 Sanger 测序对先证者及家系成员进行了验证 (图 2、3), 发现先证者及家系成员也携带外显子组测序鉴定出的 R558H 突变和 (或) S411Cfs*131 突变。

2.3 生物信息学软件进行突变蛋白功能预测

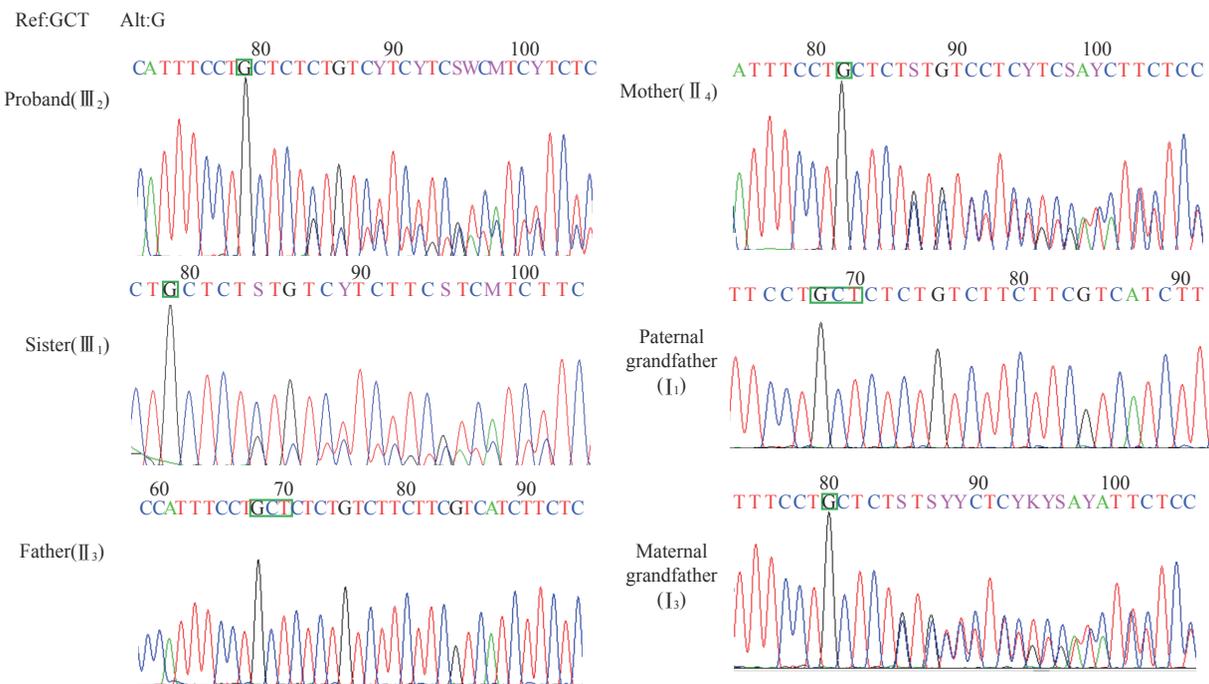
利用生物信息学软件对 R558H 突变进行蛋白功能损害程度预测, 6 种生物信息学软件的分析结果均提示该突变为损害突变: CADD 软件显示损害程度为 27.7 (分值 ≥ 20 为损害); DANN 软件提示损害程度为 0.999 (分值 ≥ 0.98 为损害); MetaSVM (D 为损害)、Polyphen2 (D 为损害)、SIFT (D 为损害) 和 M-CAP 软件 (D 为损害) 均提示损害突变。使用 Swiss-



Note: ref—reference allele; alt—alter allele. III₂, III₁, II₃, and I₁ all carried the G/A heterozygous missense mutation.

图2 *WFS1* 基因 R558H 突变测序图

Fig 2 Sequencing of R558H mutation of *WFS1* gene



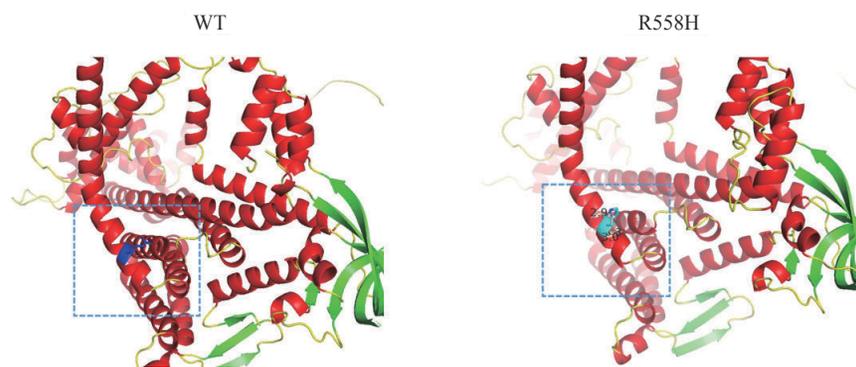
Note: ref—reference allele; alt—alter allele. III₂, III₁, II₄ and I₃ all carried the GCT/G heterozygous frameshift mutation.

图3 *WFS1* 基因 S411Cfs*131 突变测序图

Fig 3 Sequencing of S411Cfs*131 mutation of *WFS1* gene

Model 软件构建野生型和突变型 wolframin 蛋白的三维结构, 并用 PyMOL 软件进行可视化, 可以观察到 R558H 错义突变附近蛋白质结构的改变 (图 4), 其中 R558H 错义突变位于 wolframin 蛋白 α 螺旋结构域

上。Clustal Omega 软件提示, 经对比该突变区域的氨基酸序列在人类、斑马鱼、黑猩猩、狗、小鼠、大鼠、牛、猕猴、鸡、非洲爪蟾、果蝇和疟蚊共 12 个物种中均具有较高的保守性 (图 5)。



Note: WT—wild-type wolfram protein; R558H—R558H mutant wolfram protein. Dashed boxes indicate the protein structures surrounding the 558 amino acids. Red indicates the α -helix of the secondary structure of wolfram protein; green indicates the β -sheet of the secondary structure of wolfram protein.

图4 Wolfram 蛋白野生型及突变型三维结构

Fig 4 Three-dimensional structures of wild-type and mutant wolfram proteins

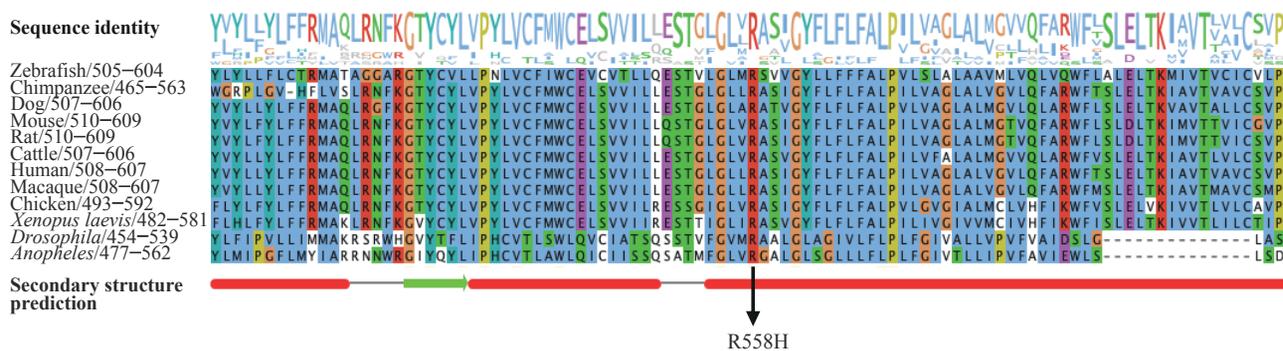


图5 *WFS1* 突变区域氨基酸序列保守性分析

Fig 5 Conservative analysis of amino acid sequences of *WFS1* mutation region

3 讨论

全外显子组测序技术对于鉴定散发糖尿病和糖尿病家系的致病基因来说是一种简便、高效的方法,对糖尿病的遗传分子诊断和治疗具有重要意义^[8-9]。2019年发表在 *Nature* 上的一项2型糖尿病 (type 2 diabetes, T2D) 全外显子组测序研究^[10],收集并分析了来自5个不同种族 (西班牙裔、欧裔、美国非裔、东亚及南亚人群) 的20 791例T2D患者和24 440例对照,鉴定出4个基因上的罕见突变与T2D发病相关;同时显示由全外显子组测序发现的T2D罕见变异可解释25%的T2D的遗传度,远超全基因组关联研究 (Genome-Wide Association Study, GWAS) 的1.96%解析度。另一项研究^[11]对1个由16个家庭成员组成的3代糖尿病家系进行全外显子组测序,首次鉴定出该家系中存在早期内体抗原1 (early endosome antigen 1, *EEA1*) 基因的N1072K突变,该突变可能是该家系罹患T2D的原因。

Wolfram综合征是一种常染色体隐性遗传病。现

已明确90%~95%的Wolfram综合征是由染色体4p16.1的*WFS1*基因突变所致,患者为突变纯合子或复合突变杂合子,前者多有近亲通婚^[12]。*WFS1*基因有8个外显子,编码890个氨基酸组成的蛋白质woframin;该蛋白有8个跨膜节段,主要在脑、胰腺及心肌内表达。Wolfram是跨膜糖蛋白,仅在内质网表达,与膜运输、内质网应激的未折叠蛋白反应有关^[13-15]。Wolfram综合征主要有糖尿病、视神经萎缩、尿崩症及神经性耳聋共4种临床表现;糖尿病及视神经萎缩较早出现,确诊者均有这2种表现;尿崩症及神经性耳聋仅见于2/3的患者;仅12%~54%的患者同时具有4种临床表现。此外,多种神经系统疾病,如认知障碍、眼球震颤和小脑性共济失调,可在患者起病30年后发展,并与该疾病的早期死亡有关^[16]。其中,糖尿病常是首发疾病,发病年龄平均为6周岁,为胰岛素依赖型糖尿病^[17]。Wolfram综合征在基因型及临床表型上具有高度异质性。虽然突变位点主要集中在8号外显子,但不同突变位点表现出不同的临床表型;且同一突变在不同人群都可表现出

不同的疾病特点^[18]。复杂的 *WFS1* 基因型-表型相关性给该综合症的诊断带来了一定的困难。

本研究利用家系全外显子组测序迅速定位2个糖尿病患者均携带 *WFS1* 基因的复合杂合突变 R558H 和 S411Cfs*131, 且2个突变分别来自父亲和母亲。错义突变 R558H 在人群中罕见, 而移码突变 S411Cfs*131 则为国际上首次发现的新突变。先证者临床表型与 *WFS1* 基因致病的临床表型相符合, 家系内表型和基因型共分离。其中, R558H 突变最早于2003年首次在意大利 Wolfram 综合征人群中被报道^[19]。2004年和2007年2个关于欧裔人群的研究^[18,20]又相继在 Wolfram 综合征家系中筛查到了这一突变; 携带该突变的患者临床表型较轻, 除了糖尿病和视神经萎缩以外, 没有出现耳聋、尿崩症和神经系统的问题; 其中1例患者在29和35岁才分别罹患糖尿病和视神经萎缩, 随访至38岁时仍没有出现其他症状。本研究的家系中2例糖尿病患者都是于青少年阶段起病, 于起病9年后开始出现视神经萎缩, 与文献报道的病例表型接近, 提示 *WFS1* 基因型-表型之间存在一定的相关性。此外, 2例患者还携带 S411Cfs*131 移码突变, 且2例患者均在年龄较小时发病, 是否出现尿崩症、神经性耳聋, 以及其他泌尿系统和神经系统异常等仍需继续观察; 因此, 临床上仅仅根据患者现有的临床表现难以做出准确的诊断。本研究通过全外显子组测序这一遗传病诊断的重要手段, 明确了患者患有 Wolfram 综合征, 提示利用全外显子组测序可实现该病的早期诊断。对该类患者可进行纯音听力检测、禁水加压素试验、颅脑磁共振成像等相关检查, 及时随访, 有望实现早期干预及治疗。

此外, 本研究发现的 R558H 错义突变位于 wolframin 蛋白的 α 螺旋结构域。 α 螺旋是跨膜蛋白存在于磷脂双分子层的主要结构域, 其外侧集中了大量的疏水侧链基团, 而内侧则含有带电的亲水侧链基团, 这提示 R558H 突变可能通过改变蛋白质的亲水性和疏水性从而影响蛋白质的稳定性和构象。蛋白稳

定性的改变可进一步影响其细胞膜运输、分泌、加工或内质网钙离子稳态的破坏, 激活内质网未折叠蛋白反应, 促进细胞凋亡。

综上所述, 本研究通过全外显子组测序鉴定出的 *WFS1* 基因罕见错义突变 R558H 和新的移码突变 S411Cfs*131 为该家系 Wolfram 综合征的致病基因突变, 携带该复合杂合突变的人群主要临床表现为糖尿病和视神经萎缩, 不排除将来罹患其他系统障碍的可能性, 应注意继续随访其表型。这2个突变对 wolframin 蛋白功能的影响有待于进一步研究。

利益冲突声明/Conflict of Interests

本研究不存在利益冲突。

The authors declare no competing interests.

伦理批准和知情同意/Ethics Approval and Patient Consent

该研究获得了新乡医学院第一附属医院伦理委员会的批准 (批件号 EC-023-084)。家系中所有受试者均已签署知情同意书。

The study was approved by the Human Research Ethics Committee of The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University (Approval Letter: EC-023-084). All the objects in the family have signed an informed consent.

作者贡献/Authors' Contributions

孟祥雨、徐云、耿瑞娜负责临床数据收集; 赖思宇负责提取基因组DNA; 张红、张蓉负责全外显子组测序和生物信息学分析; 闫丹丹、陈香慧完成了 Sanger 测序验证; 孟祥雨、严婧撰写论文; 胡承对论文进行了指导; 严婧负责修改论文、指导论文。稿件的最终版本得到了所有作者的认可。

MENG Xiangyu, XU Yun and GENG Ruina collected the clinical data. LAI Siyu extracted genomic DNA. ZHANG Hong and ZHANG Rong performed the whole exome sequencing and bioinformatics analysis. YAN Dandan and CHEN Xianghui performed the Sanger sequencing. MENG Xiangyu and YAN Jing wrote the manuscript. HU Cheng provided advice and participated in discussions throughout this work. YAN Jing revised the manuscript and directed the research. The final version of the manuscript has been recognized by all authors.

- Received: 2023-02-17
- Accepted: 2023-07-21
- Published online: 2023-07-28

参 · 考 · 文 · 献

- [1] JORDAN D M, DO R. Using full genomic information to predict disease: breaking down the barriers between complex and Mendelian diseases[J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2018, 19: 289-301.
- [2] SULLIVAN J A, SCHOCH K, SPILLMANN R C, et al. Exome/genome sequencing in undiagnosed syndromes[J]. *Annu Rev Med*, 2023, 74: 489-502.
- [3] LORD J, MCMULLAN D J, EBERHARDT R Y, et al. Prenatal exome sequencing analysis in fetal structural anomalies detected by ultrasonography (PAGE): a cohort study[J]. *Lancet*, 2019, 393(10173): 747-757.



- [4] WRIGHT C F, FITZPATRICK D R, FIRTH H V. Paediatric genomics: diagnosing rare disease in children[J]. *Nat Rev Genet*, 2018, 19(5): 253-268.
- [5] JURGENS S J, CHOI S H, MORRILL V N, et al. Analysis of rare genetic variation underlying cardiometabolic diseases and traits among 200 000 individuals in the UK Biobank[J]. *Nat Genet*, 2022, 54(3): 240-250.
- [6] ZHAO J, ZHANG S Q, JIANG Y, et al. Mutation analysis of the *WFS1* gene in a Chinese family with autosomal-dominant non-syndromic deafness[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 22180.
- [7] ZHANG H C, COLCLOUGH K, GLOYN A L, et al. Monogenic diabetes: a gateway to precision medicine in diabetes[J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(3): e142244.
- [8] LI X H, QUICK C, ZHOU H F, et al. Powerful, scalable and resource-efficient meta-analysis of rare variant associations in large whole genome sequencing studies[J]. *Nat Genet*, 2023, 55(1): 154-164.
- [9] GIBBS R A. The human genome project changed everything[J]. *Nat Rev Genet*, 2020, 21(10): 575-576.
- [10] FLANNICK J, MERCADER J M, FUCHSBERGER C, et al. Exome sequencing of 20 791 cases of type 2 diabetes and 24 440 controls[J]. *Nature*, 2019, 570(7759): 71-76.
- [11] TANAKA D, NAGASHIMA K, SASAKI M, et al. Exome sequencing identifies a new candidate mutation for susceptibility to diabetes in a family with highly aggregated type 2 diabetes[J]. *Mol Genet Metab*, 2013, 109(1): 112-117.
- [12] PALLOTTA M T, TASCINI G, CRISPOLDI R, et al. Wolfram syndrome, a rare neurodegenerative disease: from pathogenesis to future treatment perspectives[J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1): 238.
- [13] MORIKAWA S, URANO F. The role of ER stress in diabetes: exploring pathological mechanisms using Wolfram syndrome[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24(1): 230.
- [14] CROUZIER L, DANESE A, YASUI Y, et al. Activation of the sigma-1 receptor chaperone alleviates symptoms of Wolfram syndrome in preclinical models[J]. *Sci Transl Med*, 2022, 14(631): eabh3763.
- [15] WANG L L, LIU H Y, ZHANG X F, et al. *WFS1* functions in ER export of vesicular cargo proteins in pancreatic β -cells[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 6996.
- [16] CHEN Y, ZHANG M, ZHOU Y Y, et al. Case report: a novel mutation in *WFS1* gene (c.1756G>A p.A586T) is responsible for early clinical features of cognitive impairment and recurrent ischemic stroke[J]. *Front Genet*, 2023, 14: 1072978.
- [17] KABANOVSKI A, DONALDSON L, MARGOLIN E. Neuro-ophthalmological manifestations of Wolfram syndrome: case series and review of the literature[J]. *J Neurol Sci*, 2022, 437: 120267.
- [18] SMITH C J, CROCK P A, KING B R, et al. Phenotype-genotype correlations in a series of wolfram syndrome families[J]. *Diabetes Care*, 2004, 27(8): 2003-2009.
- [19] COLOSIMO A, GUIDA V, RIGOLI L, et al. Molecular detection of novel *WFS1* mutations in patients with Wolfram syndrome by a DHPLC-based assay[J]. *Hum Mutat*, 2003, 21(6): 622-629.
- [20] CANO A, ROUZIER C, MONNOT S, et al. Identification of novel mutations in *WFS1* and genotype-phenotype correlation in Wolfram syndrome[J]. *Am J Med Genet A*, 2007, 143A(14): 1605-1612.

[本文编辑] 崔黎明

学术快讯

上海交通大学医学院附属第九人民医院多学科交叉协作项目 团队发表最新研究成果

2023年7月10日,上海交通大学医学院附属第九人民医院骨科、眼科、口腔颌面-头颈肿瘤科多学科交叉协作项目研究团队在《美国科学院院报》(PNAS)上发表论文 *Metallacage-based enhanced PDT strategy for bacterial elimination via inhibiting endogenous NO production*。该研究项目提供了光动力治疗细菌感染的新思路,有望克服抗生素过度使用导致的细菌耐药性,并应用于骨科、口腔科、眼科等领域内耐药细菌的感染治疗。