

通过迷你基因实验证实4个与X连锁Alport综合征相关的同义变异改变了IV型胶原 $\alpha 5$ 链基因的剪接过程

崔巧梅^{1,2}, 邵乐平^{2*}

¹青岛大学青岛医学院, 山东 青岛

²康复大学青岛医院(青岛市市立医院)肾内科, 山东 青岛

收稿日期: 2026年4月12日; 录用日期: 2026年5月6日; 发布日期: 2026年5月13日

摘要

背景: X连锁Alport综合征(X-linked Alport syndrome, XLAS)是一种由COL4A5基因突变所致的遗传性肾小球疾病。剪接变异是XLAS的核心致病机制之一。同义变异虽不直接改变基因编码序列,但可能通过干扰剪接调控信号、破坏前体mRNA的正常剪接过程,从而影响基因的正常表达。然而,这类变异的致病性判定常存在较大挑战,需要通过转录本分析来确定剪接模式并评估致病性,但此类分析并非总能实现。方法:我们从ClinVar数据库中收集了COL4A5基因中所有的同义变异。运用SpliceAI、BDGP、HSF等生物信息学工具预测这些变异对经典剪接位点及剪接调控辅助元件的影响,进而筛选出候选剪接变异。通过迷你基因实验进一步验证这些变异对前体mRNA剪接过程的影响。最后,根据美国医学遗传学和基因组学学会(ACMG)标准和指南对识别出来的剪接变异重新分类。结果:迷你基因实验结果证实:变异c.465G>A, c.3942G>A导致相应外显子完全跳跃;变异c.4953C>T显著增加了外显子25完全跳跃的比例,但仍保留少量正常转录本;变异c.1683A>T导致24号外显子部分缺失。最后,根据ACMG标准和指南,我们将识别出来的这4个影响剪接的同义变异重新判定为致病性变异。结论:本研究结合生物信息学分析工具与体外迷你基因实验,对已知同义变异的致病性重新评估,为XLAS的变异解读及临床诊断提供理论依据。

关键词

遗传性肾脏病, Alport综合征, 剪接, COL4A5基因

Minigene Assays Validate That Four Synonymous Variants Associated with X-Linked Alport Syndrome Alter the Splicing of the Collagen IV $\alpha 5$ Gene

*通讯作者。

文章引用: 崔巧梅, 邵乐平. 通过迷你基因实验证实4个与X连锁Alport综合征相关的同义变异改变了IV型胶原 $\alpha 5$ 链基因的剪接过程[J]. 临床医学进展, 2026, 16(5): 804-815. DOI: 10.12677/acm.2026.1651876

Qiaomei Cui^{1,2}, Leping Shao^{2*}¹Qingdao Medical College, Qingdao University, Qingdao Shandong²Department of Nephrology, Qingdao Hospital of University of Health and Rehabilitation Sciences (Qingdao Municipal Hospital), Qingdao Shandong

Received: April 12, 2026; accepted: May 6, 2026; published: May 13, 2026

Abstract

Background: X-linked Alport syndrome (XLAS) is a hereditary glomerular disease caused by pathogenic variants in the *COL4A5* gene. Splicing variants represent one of the key pathogenic mechanisms underlying XLAS. Although synonymous variants do not directly alter the coding sequence, they may disrupt splicing regulatory signals and interfere with normal pre-mRNA splicing, thereby impairing gene expression. Nevertheless, determining the pathogenicity of such variants remains challenging. Transcript analysis is required to characterize splicing patterns and evaluate clinical significance, yet functional verification is not always feasible in routine practice. **Methods:** All synonymous variants in the *COL4A5* gene were retrieved from the ClinVar database. Bioinformatic tools, including SpliceAI, BDGP, and HSF, were employed to predict the effects of these variants on canonical splice sites and auxiliary splicing regulatory elements, followed by screening candidate splice-altering variants. The impact of these variants on pre-mRNA splicing was further validated using minigene assays. Finally, all identified splicing-related synonymous variants were reclassified according to the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) criteria and guidelines. **Results:** Minigene assays confirmed that variants c.465G>A and c.3942G>A led to complete skipping of their corresponding exons; variant c.4953C>T significantly increased the proportion of exon 25 skipping, while retaining a small amount of normal transcript; and variant c.1683A>T resulted in partial deletion of exon 24. Based on the ACMG standards and guidelines, these four synonymous variants were reclassified as pathogenic. **Conclusion:** This study combined bioinformatics analysis tools with in vitro minigene assays to re-evaluate the pathogenicity of known synonymous variants, providing a theoretical basis for variant interpretation and clinical diagnosis of XLAS.

KeywordsHereditary Kidney Disease, Alport Syndrome, Splicing, *COL4A5* Gene

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Open Access

1. 引言

Alport 综合征(Alport Syndrome, AS)是一种以血尿、进行性蛋白尿和肾功能减退为特征的遗传性肾小球基底膜疾病,是最常见的遗传性肾脏疾病,部分患者可伴有感音神经性耳聋、眼部病变等肾外表现[1]-[3]。其致病机制主要是由编码IV型胶原 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 链的 *COL4A3*、*COL4A4* 和 *COL4A5* 基因的致病性变异所致。这些 α 链以特定的形式组装成异源三聚体,对维持肾小球基底膜的结构与滤过功能至关重要。基因突变会破坏三聚体形成,导致 α 链结构缺陷、基底膜增厚分层及断裂,最终引发肾功能损害及相关肾外临床表现[4] [5]。根据遗传模式,AS 可分为: X 连锁 Alport 综合征(X-linked Alport Syndrome, XLAS)、常染色

体隐性 Alport 综合征(Autosomal Recessive Alport Syndrome, ARAS)、常染色体显性 Alport 综合征(Autosomal Dominant Alport Syndrome, ADAS)和双基因 Alport 综合征[6]-[9]。其中由 *COL4A5* 基因突变引起的 XLAS 是最常见类型, 约占该病患者总数的 85% [10] [11]。男性 XLAS 患者表型更为严重, 多在 20 至 30 余岁进展至终末期肾病(End Stage Renal Disease, ESRD) [12]。目前该病尚无根治疗法, 早期诊断与干预延缓肾功能进展是该病最主要的治疗措施[13]。致病性变异的检出是诊断 AS 的最佳证据[14]。近年来随着基因检测技术的进步和广泛应用, 越来越多的变异被检测出来, 但对这些变异的致病性判定仍然存在挑战。

前体 mRNA 剪接是基因表达过程中的关键环节, 受到多种顺式作用元件与反式作用因子的精密调控。研究已证实, 剪接变异是遗传病的重要病因。此类变异可通过破坏原始剪接位点, 影响分支点、多聚嘧啶区、剪接增强子或沉默子等关键调控元件, 干扰正常剪接过程[15] [16]。同义变异虽不直接改变基因编码序列, 但可能通过干扰剪接调控信号、破坏前体 mRNA 的正常剪接过程, 最终影响基因的正常表达。由于这类变异在常规分析中难以识别, 需借助体内 RNA 测序或体外剪接实验以明确剪接模式并评估变异致病性, 但此类方法在临床实践中并非总能顺利实施[14] [16]。因此, 本研究结合生物信息学工具与迷你基因分析技术, 系统探究已报道的 *COL4A5* 基因同义变异对前体 mRNA 剪接过程的影响, 并依据美国医学遗传学与基因组学学会(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)标准与指南对这些变异的致病性重新分类[17], 旨在为 Alport 综合征的诊断、治疗、预后评估及遗传咨询提供遗传分子学证据。

2. 材料和方法

2.1. 变异的选择

本研究所分析的 *COL4A5* 基因(NM_033380.3)同义变异均来源于 ClinVar 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>, 访问时间: 2024 年 4 月)。为评估这些变异对剪接的潜在影响, 我们采用多种生物信息学工具进行预测分析: 使用 SpliceAI (<https://spliceailookup.broadinstitute.org/>)预测变异对剪接供体位点(DS)和受体位点(AS)的影响; 使用伯克利果蝇基因组计划剪接位点预测工具(BDGP) (<https://www.fruitfly.org/>)评估变异对剪接位点强度的改变; 应用人类剪接位点预测工具(HSF) (<https://hsf.genomnis.com/>)进一步判断变异是否影响经典剪接位点或剪接调控元件[如: 外显子剪接增强子(Exonic Splicing Enhancer, ESE)或剪接沉默子(Exonic Splicing Silencer, ESS)]。筛选标准: SpliceAI 评分 $\Delta\text{Score} \geq 0.2$, 且同时获得 BDGP 与 HSF 支持证据的变异将被纳入候选剪接变异进行进一步分析。

在剪接过程中, SR 蛋白和 hnRNPs 蛋白是两类核心的调控因子, 二者相互拮抗, 通过结合前体 mRNA 上的特定序列, 决定外显子的保留或跳过。SR 蛋白通过结合外显子上的 ESE, 协助剪接体识别较弱的剪接位点, 从而促进剪接。hnRNPs 蛋白则通过识别外显子的 ESS 或内含子上的 ISS, 或与 SR 蛋白竞争结合邻近的 RNA 位点, 发挥抑制剪接的作用。因此, 变异可通过削弱 SR 蛋白与 RNA 的结合或增强 hnRNPs 蛋白与 RNA 的结合, 从而影响剪接体对外显子的识别, 导致外显子跳跃。因此, 我们使用 DeepCLIP (<https://DeepCLIP-web.compbio.sdu.dk/>)分析变异对参与外显子调控的 SR 蛋白及 hnRNP 蛋白与 RNA 结合能力的影响[18]。

2.2. 迷你基因

基因组 DNA 采用商业 DNA 纯化试剂盒(Promega 公司, 美国威斯康星州麦迪逊市)从健康人类外周血白细胞中提取, 操作流程严格遵循厂商说明。通过 PCR 扩增包含目标外显子及其侧翼内含子区域的野生型基因片段, 并采用限制性内切酶消化与连接法将其克隆至迷你基因载体中(pSPL3), 从而获得野生型迷你基因构建体。然后, 以该野生型迷你基因构建体为模板, 使用 PrimeSTAR 突变试剂盒(Takara Bio, 日本滋贺县)进行定点突变, 引入目标变异, 从而获得突变型迷你基因构建体。迷你基因 pSPL3 外显子捕

获载体模式图见图 S1, 所有扩增与诱变所用引物序列见表 S1 和表 S2。构建完成的所有迷你基因克隆均经 Sanger 测序验证。

2.3. 剪接分析

使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, 美国卡尔斯巴德) 分别将 2 μ L 野生型与突变型质粒瞬时转染至 HEK 293T 和 HeLa 细胞。为抑制无义介导的 mRNA 降解(NMD), 在提取 RNA 前, 将细胞与 200 μ g/mL 嘌呤霉素共孵育 6 小时。转染 48 小时后, 使用 RNeasy RNA 分离试剂(Vazyme)提取总 RNA。取 1 μ g 总 RNA, 采用 Evo M-MLV Plus cDNA Synthesis 试剂盒进行反转录。PCR 产物通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, 对条带进行成像与定量分析。使用 ImageJ 软件对剪接事件进行定量, 计算异常剪接转录本占比(异常转录本百分比 = 异常条带强度/总条带强度 \times 100%)。统计分析采用 OriginPro 软件完成。野生型与突变型构建体的统计比较采用非配对 Student's t 检验进行。误差条表示标准误(n = 3)。P < 0.05 视为具有统计学意义。

3. 结果

本研究中, 基于前述筛选标准, 我们最终纳入了 4 个同义突变(c.465G>A、c.1683A>T、c.3942G>A、c.4953C>T), 筛选出的变异特征及其生物信息工具预测结果详见表 1。我们一共构建了 4 个野生型对照迷你基因, 分别是 COL4A5 基因的外显子 8 (pSPL3 Ex8)、外显子 24 (pSPL3 Ex24)、外显子 44 (pSPL3 Ex44) 和外显子 52 (pSPL3 Ex52)。随后通过定点诱变技术引入相应的点突变, 构建突变型迷你基因。构建成功的野生型对照迷你基因和突变型迷你基因的 Sanger 测序结果见图 S2。最终, 体外迷你基因实验结果证实, 所有候选变异均不同程度地破坏了前体 mRNA 的正常剪接过程, 且均不被无义介导的 mRNA 降解; RT-PCR 琼脂糖凝胶电泳图及剪接模式图如图 1 所示。为进一步探究变异对剪接反式作用因子识别顺式作用元件能力的影响, 我们额外使用了 DeepCLIP 软件进行分析, 结果见表 S3。此外, 我们预测了这些异常剪接事件对蛋白质水平的影响; 结果汇总于表 2。

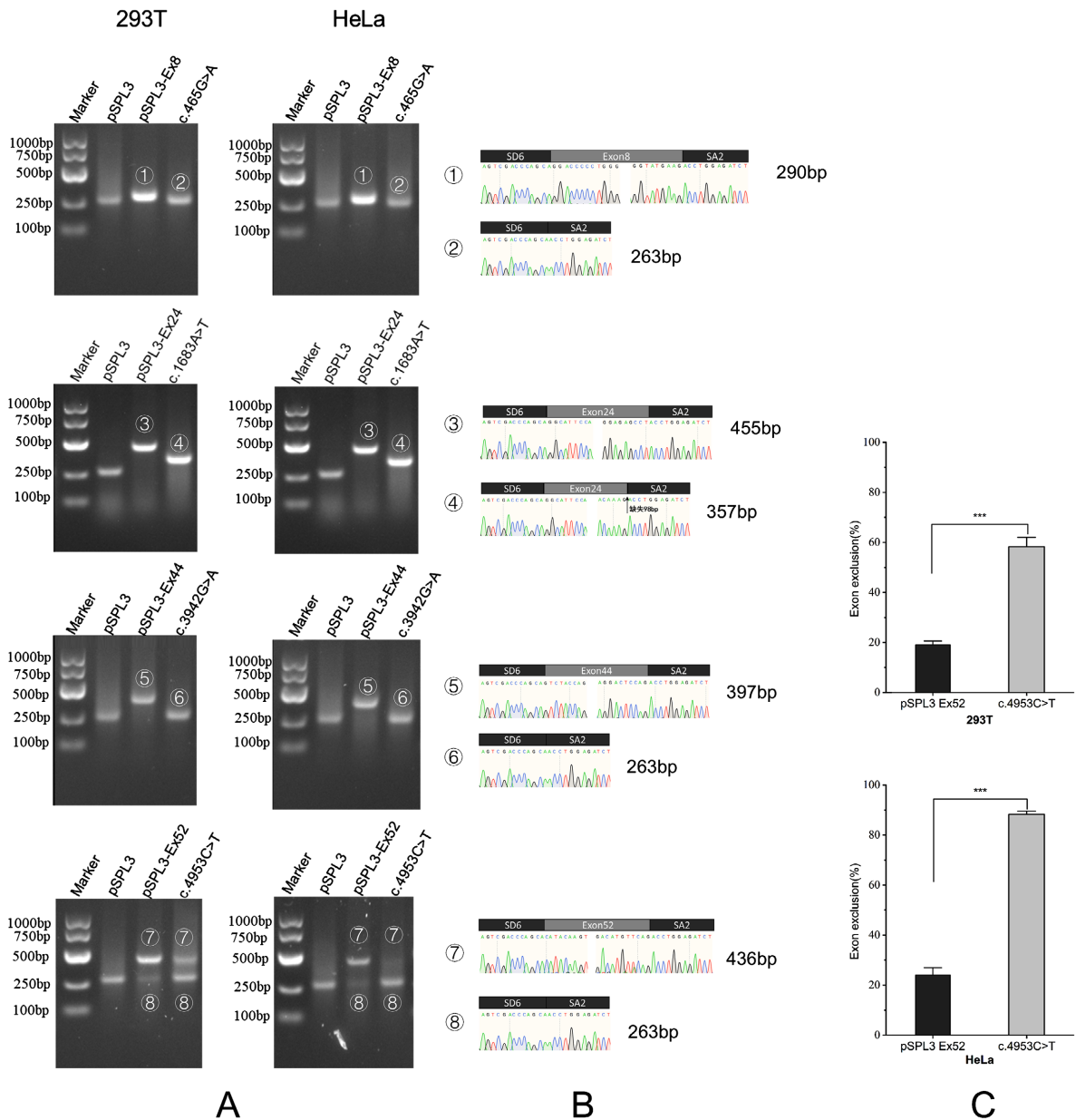
Table 1. Characteristics and bioinformatic predictions of selected COL4A5 variants in this study

表 1. 本研究选取的 COL4A5 基因变异的特征及生物信息学预测结果

变异	氨基酸	外显子 (长度/bp)	位置	Splice AI	BDGP (野生型评分 \rightarrow 突变型 评分)	HSF
c.465G>A	p.Lys155=	Exon 8 (27 bp)	-1	WT DS: 0.67 (DL)	WT DS: DL 0.07 (1 \rightarrow 0.93)	破坏野生型供体位点
c.1683A>T	p.Gly561=	Exon 24 (192 bp)	-97	WT DS: 0.22 (DL) 突变区域: 0.94 (DG)	WT DS: ns (0.71 \rightarrow 0.71) 突变区域: DG 0.99 (0 \rightarrow 0.99)	改变了辅助调节元 件: Δ ESEs/ESSs = -12 创建新的野生型 供体位点
c.3942G>A	p.Gln1314=	Exon 44 (134)	-1	WT DS: 0.66 (DL)	WT DS: DL 0.71 (0.96 \rightarrow 0.25)	破坏野生型供体位点
c.4953C>T	p.Tyr1651=	Exon 52 (173)	-42	WT AS: 0.34 (AL) WT DS: 0.3 (DL)	WT AS: ns (0.99 \rightarrow 0.99) WT DSite: ns (0.92 \rightarrow 0.92) 突变区域: AG 0.07 (0.64 \rightarrow 0.71)	改变了辅助调节元 件: Δ ESEs/ESSs = -6

注: COL4A5 基因参考序列: NC_000023.11, NM_000495.5。“=”表示基因变异后氨基酸未发生变化, 即同义变异。变异位置: “+”表示距外显子 5'端的距离, “-”表示距外显子 3'端的距离。AL: 受体位点削弱; AG: 受体位点增强; DL: 供体位点削弱; DG: 供体位点增强; WT: 野生型; DS: 供体剪接位点; AS 受体剪接位点。ESEs: 外显子剪接增强子; ESSs: 外显子剪接抑制子; 增加一个 ESE 基序或减少一个 ESS 基序记为 1; 相反, 破坏一个 ESE 基序或生成一个 ESS 基序记为-1; Δ ESEs/ESSs 表示 ESE 和 ESS 变化的总和。

根据三种生物信息学工具的预测, 变异 c.465G>A 和 c.3942G>A 破坏了野生型供体剪接位点(WT DS 的 BDGP 评分分别为: 1.0 降至 0.93、0.96 降至 0.25), 削弱 SR 蛋白与 ESE 的结合, 从而降低了剪接体对野生型剪接位点的识别强度。迷你基因实验进一步证实变异 c.465G>A 和 c.3942G>A 均导致完全跳跃相应外显子。其中, 变异 c.465G>A 完全跳跃 8 号外显子(长度 27 bp), 导致核苷酸 3 的整数倍缺失, 可能造成框内改变。相比之下, 变异 c.3942G>A 完全跳跃 44 号外显子(长度 134 bp)。由于跳跃的核苷酸数目非三的倍数, 预测该变异将导致移码改变并产生截短蛋白。



A 为野生型对照及突变型迷你基因 HEK 293T 和 HeLa 细胞中完整的琼脂糖凝胶电泳结果; B 为相应转录本条带剪接模式图及代表性 Sanger 测序结果; C 为野生型对照 pSPL3 Ex52 及变异 c.4953C>T 迷你基因外显子排除率统计分析结果。采用非配对 Student's t 检验进行。误差条表示标准误(n=3)。*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001。

Figure 1. Minigene transcript analysis
图 1. 迷你基因转录本分析

Table 2. Splicing outcomes and predicted protein effects of *COL4A5* variants
表 2. *COL4A5* 基因变异的剪接结果及预测的蛋白影响

变异	MAF	疾病	剪接结果 ^a (HEK293/HeLa)	氨基酸改变	蛋白影响	ACMG 分类
c.465G>A	未发现	NP	外显子 8 完全跳跃 (100%/100%)	p.Gly147_Lys155del	胶原区域插入 9 个氨基酸	VUS→LP
c.1683A>T	未发现	XLAS	外显子 24 的 3'端缺失 98 bp (100%/100%)	p.Glu562Trp fs*5	截短蛋白	VUS→P
c.3942G>A	未发现	XLAS	外显子 44 完全跳跃 (100%/100%)	p.Leu1271*	截短蛋白	VUS→P
c.4953C>T	未发现	NP	正常转录本(42.3%/11.7%) 外显子 52 完全跳跃 (57.7%/88.3%)	p.His1608*	截短蛋白	LB→P

注: XLAS, X 连锁 Alport 综合征; MAF, 最大等位基因频率; NP, 未提供; LB, 可能良性; VUS, 意义不明; LP, 可能致病; P, 致病。^a剪接结果: 括号内表示每种转录本的比例。

同义变异 c.1683A>T 位于 24 号外显子 3'端上游 97 bp 处。该变异被预测三种生信软件会改变剪接调控元件(HSF: Δ ESEs/ESSs = -12), 破坏野生型供体剪接位点[SpliceAI 评分: 0.22 (DL)], 并在突变位置处形成新的供体剪接位点[SpliceAI 评分: 0.94 (DG)]。DeepCLIP 显示该变异会显著降低 SR 蛋白与 ESE 的结合能力。迷你基因实验进一步证实, 该变异未产生野生型转录本, 仅生成带有 98 bp 缺失的转录本, 表现为部分外显子缺失, 预测将导致移码改变并生成截短蛋白。

变异 c.4953C>T 被预测会降低野生型供体剪接位点和受体剪接位点的识别强度[SpliceAI 评分为: 0.34 (AL)、0.3 (DL)], 以及 ESEs/ESSs 的比例失衡(Δ ESEs/ESSs = -6)。DeepCLIP 显示该变异在降低 SR 蛋白与 ESE 结合能力的同时还会增加 hnRNPs 蛋白与 ESS 的结合。体外迷你实验结果证实该变异同时检测到正常转录本和 52 号外显子跳跃型转录本, 且外显子跳跃比例较野生型显著增加(具有统计学意义)。

变异体致病性的准确评估对 AS 的诊断至关重要。基于上述体外功能实验的综合数据、数据库中的现有疾病信息以及最大等位基因频率数据(GenomeAD 数据库, <https://gnomad.broadinstitute.org/>, 访问时间: 2024 年 4 月), 我们根据 ACMG 标准与指南将变异 c.465G>A、c.1683A>T、c.3942G>A、c.4953C>T 重新分类为致病性变异。

4. 讨论

X 连锁 Alport 综合征是由 *COL4A5* 基因致病性变异引起的遗传性肾小球疾病, 是 Alport 综合征中最主要的遗传类型。受 X 连锁遗传模式影响, 男性 XLAS 患者通常发病更早、病情进展更快, 且表现出显著的基因型 - 表型相关性[19][20]。可变剪接已被证实与进化变异的增加相关, 尤其能显著提升新外显子生成或缺失的发生频率[21]。基因新增外显子的过程(即外显子化机制)可能仅导致部分转录本包含该外显子, 原始基因形式仍得以保留, 从而使新形式获得独立演化的可能。根据定义, 同义突变虽不改变蛋白质序列, 但可能影响剪接调控元件并改变外显子保留率, 从而对人类疾病发生及新型可变剪接亚型的产生具有重要影响。然而, 对此类变异是否通过影响剪接从而导致蛋白质截短的可靠预测具有一定难度, 通常需依赖体内转录本分析或体外功能实验加以确认。由于肾脏组织中的转录本可能不稳定且通常难以获得, 因此转录分析通常难以进行。此外, 虽然关于 *COL4A5* 外周血白细胞表达转录本已被用作转录本分析的替代来源, 但是有时仍然难以提取足够数量和质量的 mRNA 来成功分析。体外迷你基因剪接实验

已逐渐成为快速、准确识别异常剪接模式的重要替代方法[14][22][23]。本研究通过开展体外微型基因实验,对已报道的同义变异进行系统验证,旨在识别潜在的致病性剪接变异,并进一步预测其对蛋白质功能可能产生的影响,为 Aplort 综合征的诊断和治疗提供分子遗传学证据。

目前已鉴定出六种不同的 IV 型胶原 α 链($\alpha 1\sim\alpha 6$),由 COL4A1~COL4A6 基因编码。它们以特定的形式组装成三螺旋体(如: $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ 、 $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ 或 $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$),从而形成基底膜的特征性网络结构。其中, $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ 三聚体是肾小球基底膜、耳蜗和眼部基底膜的主要组成部分[24]。每种 IV 型胶原 α 链均包含三个结构域:氨基端 7S 非胶原结构域、中间胶原结构域(含 Gly-X-Y 重复序列及多重中断区)以及羧基端 NC1 结构域。三条 α 链通过羧基端 NC1 结构域间的二硫键与硫酰亚胺键相互作用,并逆向盘绕形成稳定的三聚体[25]。基因变异的功能影响关键取决于其在蛋白质结构域中的位置及变异性质。多项基因型-表型相关性研究证实,具有剪接变异导致框内转录的男性 XLAS 患者比具有框外转录的患者具有更轻的表型, $\alpha 5$ (IV)链表达阳性者的临床表现较无 $\alpha 5$ (IV)链表达者更为轻微[12]。位于胶原结构域的变异 c.465G>A 引起的 8 号外显子完全跳跃,导致 27 bp 核苷酸缺失,造成框内改变,通常仅导致胶原区域的部分缺失,而能保留蛋白质的整体读码框和关键的 NC1 结构域,从而仍可有带有胶原区小部分缺失的 $\alpha 5$ (IV)链的表达及三聚体形成。变异 c.4953C>T 在实验中被观察到正常转录本与外显子跳跃转录本的共存现象,故携带此类变异的患者其基底膜上仍可有少量正常 $\alpha 5$ (IV)链的表达。这种混合型剪接模式的产生,可能与此变异体外显性弱有关[16][26][27]。相比之下,变异 c.1683A>T 和 c.3942G>A 通过外显子跳跃/部分缺失导致非 3 的整倍数核苷酸的缺失,造成读码框移位,从而引入提前终止密码子,生成不稳定的截短蛋白。此类变异的关键致病机制在于其导致羧基端 NC1 结构域的缺失,造成 $\alpha 345$ (IV)三聚体无法形成。此外,含有提前终止密码子的 mRNA 常触发无义介导的 mRNA 降解(NMD)机制,导致转录本被降解,最终在受累组织的基底膜中表现为相应 $\alpha 5$ (IV)链的完全缺失[20]。

目前尚无治疗 AS 的根治方法,除了非特异性肾脏保护治疗外,致病基因 COL4A5 已成为未来治疗研发的潜在靶点。随着 RNA 靶向疗法的迅速发展,反义寡核苷酸(ASO)介导的外显子跳跃策略为纠正特定类型的剪接缺陷提供了新的治疗方向。其通过与前体 mRNA 中的关键剪接调控元件特异性结合,立体阻断异常剪接事件,引导剪接机制生成功能完全恢复或部分恢复的转录本,进而有效纠正剪接缺陷[28]。该策略已在多种遗传病的治疗中取得突破性进展,如针对杜氏肌营养不良症(DMD)的依特立生(Eteplirsen)及针对脊髓性肌萎缩症(SMA)的诺西那生钠(Nusinersen)等 ASO 药物已相继获得美国食品药品监督管理局(FDA)与欧洲药品管理局(EMA)的批准[20][29][30]。与 DMD 类似,男性 XLAS 也存在明确的基因型-表型相关性,这一特性为 COL4A5 基因 ASO 药物的开发提供理论依据,并已在小鼠模型中取得实验室阶段的进展[20]。此外,具有细胞渗透性的 RNA 靶向小分子化合物作为剪接修饰疗法的新型候选药物受到广泛关注。部分小分子可通过结合 RNA 对剪接过程产生调控作用。利司扑兰(risdiplam)作为首个治疗 SMA 的小分子剪接修饰剂获 FDA 批准[31]。利司扑兰类化合物能直接结合 SMN2 前体 mRNA,促使被跳过外显子纳入,从而恢复 SMN2 蛋白的生成。因此,本研究中识别出的由特定剪接变异导致疾病的部分患者,未来或可受益于个体化设计的靶向 RNA 治疗策略。

本研究基于迷你基因构建体鉴定出影响正常剪接过程的同义变异,但该方法存在若干局限性。首先,迷你基因实验的结果源于体外细胞实验,无法完全复刻复杂的体内生理环境;其次,迷你基因构建体仅纳入目标外显子及部分侧翼内含子序列,与天然基因组的完整结构存在差异;第三,机体普遍存在可变剪接调控特征,不同组织与细胞中剪接因此谱系存在差异,从而导致剪接模式及成熟转录本占比具有特异性。因此,迷你基因分析的结果不一定与体内结果完全一致。但尽管上述因素可能对替代肾脏组织的转录分析结果产生一定偏差,迷你基因仍然是快速识别异常剪接模式的重要替代研究手段。通过与生物信息学预测相结合,不仅能够提高致病性解读的准确性,同时也为后续个体化靶向干预策略的研发提供

理论支撑, 为优化该类疾病患者及其家系的临床诊疗与管理具有重要参考价值。

总之, 本研究通过整合体外实验与生物信息学分析, 鉴定出 4 种影响正常剪接的同义变异, 并对变异的致病性重新评估, 为 Alport 综合征的分子诊断、遗传分型、预后评估、治疗策略选择及产前咨询提供了重要的遗传学证据与临床指导价值。

基金项目

国家自然科学基金面上项目(NO. 82170717)。

参考文献

- [1] Savige, J., Gregory, M., Gross, O., Kashtan, C., Ding, J. and Flinter, F. (2013) Expert Guidelines for the Management of Alport Syndrome and Thin Basement Membrane Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, **24**, 364-375. <https://doi.org/10.1681/asn.2012020148>
- [2] Connaughton, D.M. and Hildebrandt, F. (2019) Personalized Medicine in Chronic Kidney Disease by Detection of Monogenic Mutations. *Nephrology Dialysis Transplantation*, **35**, 390-397. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfz028>
- [3] Pajari, H., Kääriäinen, H., Muhonen, T. and Koskimies, O. (1996) Alport's Syndrome in 78 Patients: Epidemiological and Clinical Study. *Acta Paediatrica*, **85**, 1300-1306. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1996.tb13915.x>
- [4] Savige, J., Sheth, S., Leys, A., Nicholson, A., Mack, H.G. and Colville, D. (2015) Ocular Features in Alport Syndrome. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, **10**, 703-709. <https://doi.org/10.2215/cjn.10581014>
- [5] Aoto, Y., Horinouchi, T., Yamamura, T., Kondo, A., Nagai, S., Ishiko, S., *et al.* (2022) Last Nucleotide Substitutions of COL4A5 Exons Cause Aberrant Splicing. *Kidney International Reports*, **7**, 108-116. <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2021.10.012>
- [6] Knebelmann, B., Breillat, C., Forestier, L., *et al.* (1996) Spectrum of Mutations in the COL4A5 Collagen Gene in X-Linked Alport Syndrome. *American Journal of Human Genetics*, **59**, 1221-1232.
- [7] Heidet, L., Arrondel, C., Forestier, L., Cohen-Solal, L., Mollet, G., Gutierrez, B., *et al.* (2001) Structure of the Human Type IV Collagen Gene COL4A3 and Mutations in Autosomal Alport Syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology*, **12**, 97-106. <https://doi.org/10.1681/asn.v12i197>
- [8] Boye, E., Mollet, G., Forestier, L., Cohen-Solal, L., Heidet, L., Cochat, P., *et al.* (1998) Determination of the Genomic Structure of the COL4A4 Gene and of Novel Mutations Causing Autosomal Recessive Alport Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, **63**, 1329-1340. <https://doi.org/10.1086/302106>
- [9] Savige, J., Renieri, A., Ars, E., Daga, S., Pinto, A.M., Rothe, H., *et al.* (2022) Digenic Alport Syndrome. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, **17**, 1697-1706. <https://doi.org/10.2215/cjn.03120322>
- [10] Morinière, V., Dahan, K., Hilbert, P., Lison, M., Lebbah, S., Topa, A., *et al.* (2014) Improving Mutation Screening in Familial Hematuric Nephropathies through Next Generation Sequencing. *Journal of the American Society of Nephrology*, **25**, 2740-2751. <https://doi.org/10.1681/asn.2013080912>
- [11] Rossanti, R., Horinouchi, T., Yamamura, T., Nagano, C., Sakakibara, N., Ishiko, S., *et al.* (2022) Evaluation of Suspected Autosomal Alport Syndrome Synonymous Variants. *Kidney360*, **3**, 497-505. <https://doi.org/10.34067/kid.0005252021>
- [12] Bekheirnia, M.R., Reed, B., Gregory, M.C., McFann, K., Shamsheersaz, A.A., Masoumi, A., *et al.* (2010) Genotype-Phenotype Correlation in X-Linked Alport Syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology*, **21**, 876-883. <https://doi.org/10.1681/asn.2009070784>
- [13] Kashtan, C.E. (2021) Alport Syndrome: Achieving Early Diagnosis and Treatment. *American Journal of Kidney Diseases*, **77**, 272-279. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2020.03.026>
- [14] Savige, J., Storey, H., Watson, E., Hertz, J.M., Deltas, C., Renieri, A., *et al.* (2021) Consensus Statement on Standards and Guidelines for the Molecular Diagnostics of Alport Syndrome: Refining the ACMG Criteria. *European Journal of Human Genetics*, **29**, 1186-1197. <https://doi.org/10.1038/s41431-021-00858-1>
- [15] Cooper, T.A., Wan, L. and Dreyfuss, G. (2009) RNA and Disease. *Cell*, **136**, 777-793. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.011>
- [16] Jaganathan, K., Kyriazopoulou Panagiotopoulou, S., McRae, J.F., Darbandi, S.F., Knowles, D., Li, Y.I., *et al.* (2019) Predicting Splicing from Primary Sequence with Deep Learning. *Cell*, **176**, 535-548.e24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.015>
- [17] Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., *et al.* (2015) Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics

- and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, **17**, 405-424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- [18] Grønning, A.G.B., Doktor, T.K., Larsen, S.J., Petersen, U.S.S., Holm, L.L., Bruun, G.H., *et al.* (2020) DeepCLIP: Predicting the Effect of Mutations on Protein-RNA Binding with Deep Learning. *Nucleic Acids Research*, **48**, 7099-7118. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa530>
- [19] Savige, J., Huang, M., Croos Dabrera, M.S., Shukla, K. and Gibson, J. (2022) Genotype-Phenotype Correlations for Pathogenic COL4A3-COL4A5 Variants in X-Linked, Autosomal Recessive, and Autosomal Dominant Alport Syndrome. *Frontiers in Medicine*, **9**, Article ID: 865034. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.865034>
- [20] Yamamura, T., Horinouchi, T., Adachi, T., Terakawa, M., Takaoka, Y., Omachi, K., *et al.* (2020) Development of an Exon Skipping Therapy for X-Linked Alport Syndrome with Truncating Variants in COL4A5. *Nature Communications*, **11**, Article 2777. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16605-x>
- [21] Modrek, B. and Lee, C.J. (2003) Alternative Splicing in the Human, Mouse and Rat Genomes Is Associated with an Increased Frequency of Exon Creation And/or Loss. *Nature Genetics*, **34**, 177-180. <https://doi.org/10.1038/ng1159>
- [22] Horinouchi, T., Nozu, K., Yamamura, T., Minamikawa, S., Nagano, C., Sakakibara, N., *et al.* (2019) Determination of the Pathogenicity of Known COL4A5 Intronic Variants by *in Vitro* Splicing Assay. *Scientific Reports*, **9**, Article No. 12696. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48990-9>
- [23] Llinares-Burguet, I., Sanoguera-Miralles, L., Valenzuela-Palomo, A., García-Álvarez, A., Bueno-Martínez, E. and Velasco-Sampedro, E.A. (2024) Splicing Dysregulation of Non-Canonical GC-5' Splice Sites of Breast Cancer Susceptibility Genes ATM and PALB2. *Cancers*, **16**, Article 3562. <https://doi.org/10.3390/cancers16213562>
- [24] Bateman, J.F., Boot-Handford, R.P. and Lamandé, S.R. (2009) Genetic Diseases of Connective Tissues: Cellular and Extracellular Effects of ECM Mutations. *Nature Reviews Genetics*, **10**, 173-183. <https://doi.org/10.1038/nrg2520>
- [25] Kalluri, R., Shield, C.F., Todd, P., Hudson, B.G. and Neilson, E.G. (1997) Isoform Switching of Type IV Collagen Is Developmentally Arrested in X-Linked Alport Syndrome Leading to Increased Susceptibility of Renal Basement Membranes to Endoproteolysis. *Journal of Clinical Investigation*, **99**, 2470-2478. <https://doi.org/10.1172/jci119431>
- [26] Luco, R.F., Pan, Q., Tominaga, K., Blencowe, B.J., Pereira-Smith, O.M. and Misteli, T. (2010) Regulation of Alternative Splicing by Histone Modifications. *Science*, **327**, 996-1000. <https://doi.org/10.1126/science.1184208>
- [27] Ule, J., Jensen, K.B., Ruggiu, M., Mele, A., Ule, A. and Darnell, R.B. (2003) CLIP Identifies Nova-Regulated RNA Networks in the Brain. *Science*, **302**, 1212-1215. <https://doi.org/10.1126/science.1090095>
- [28] Croke, S.T., Witztum, J.L., Bennett, C.F. and Baker, B.F. (2018) RNA-Targeted Therapeutics. *Cell Metabolism*, **27**, 714-739. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.004>
- [29] Sang, A., Zhuo, S., Bochanis, A., Manautou, J.E., Bahal, R., Zhong, X., *et al.* (2024) Mechanisms of Action of the US Food and Drug Administration-Approved Antisense Oligonucleotide Drugs. *BioDrugs*, **38**, 511-526. <https://doi.org/10.1007/s40259-024-00665-2>
- [30] Aartsma-Rus, A. (2018) Genetic Therapies for Spinal Muscular Atrophy Type 1. *The Lancet Neurology*, **17**, 111-112. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(17\)30436-2](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(17)30436-2)
- [31] Wang, J., Schultz, P.G. and Johnson, K.A. (2018) Mechanistic Studies of a Small-Molecule Modulator of SMN2 Splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **115**, E4604-E4612. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800260115>

附录

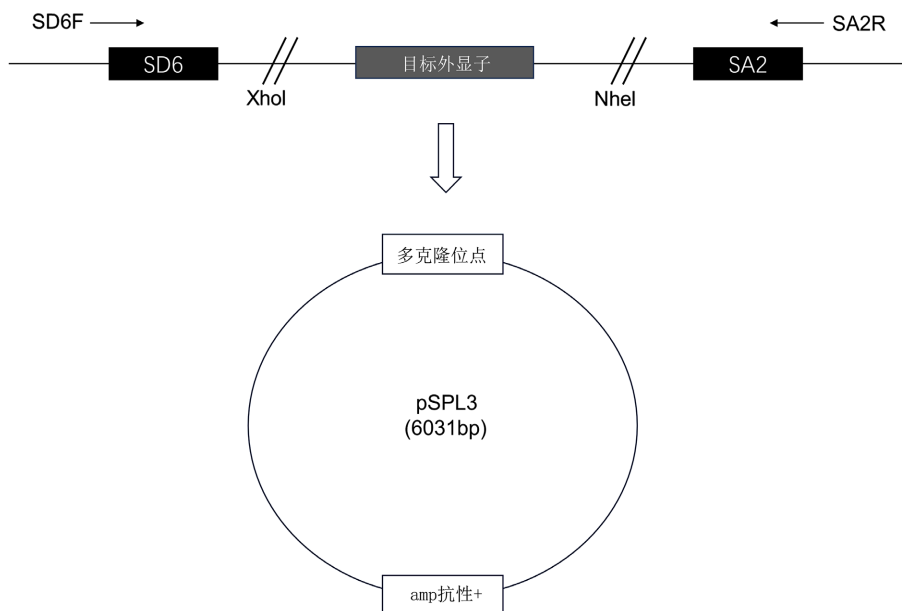


Figure S1. Schematic diagram of the minigene pSPL3 exon-trapping vector

图 S1. 迷你基因 pSPL3 外显子捕获载体模式图

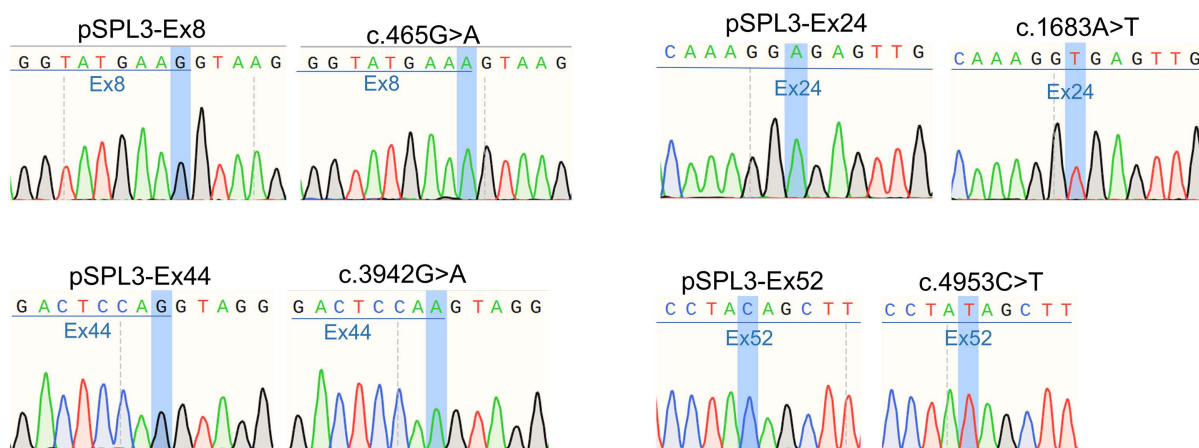


Figure S2. Representative Sanger sequencing results of wild-type and mutant minigene constructs

图 S2. 野生型及突变型迷你基因构建体代表性的 Sanger 测序结果

Table S1. Primer sequences for amplifying target exons of COL4A5

表 S1. 扩增 COL4A5 基因目标外显子的引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
外显子 8 上游引物	TGACGCTACAGCAGTCTACTCA
外显子 8 下游引物	GACTGTGACCTGATGCTTGAT
外显子 24 上游引物	ACTTGATTCAGCCCTTTGTAC
外显子 24 下游引物	GTGTTTATCTCAGCATCAGTCC

续表

外显子 44 上游引物	TAGAAAGGGAATCAGCATAGG
外显子 44 下游引物	GAAGGCTACTCAAATCCAAATA
外显子 52 上游引物	TCTTACCTCTGGGCCTGTT
外显子 52 下游引物	CTATCACAAACCAAACCTCACCT

Table S2. Mutagenesis primers for *COL4A5* variants**表 S2.** *COL4A5* 基因变异的定点诱变引物

引物名称	引物序列(5'-3')
c.465G>A 上游引物	GGATCCCAGGTATGAAAGTAAGCATCTCATTCTG
c.465G>A 下游引物	CAGAATGAGATGCTTACTTTTCATACCTGGGATCC
c.1683A>T 上游引物	GGGTGACAAAGGTGAGTTGGGTTCC
c.1683A>T 下游引物	GGAACCCAACCTCACCTTTGTCACCC
c.3942G>A 上游引物	CACCAGGACTCCAAGTAGGAAATGGAAG
c.3942G>A 下游引物	CTTCCATTTCTACTTGGAGTCCTGGTG
c.4953C>T 上游引物	CTATGCCAACTCCTATAGCTTTTGGCTGG
c.4953C>T 下游引物	CCAGCCAAAAGCTATAGGAGTTGGCATAG

Table S3. DeepCLIP analysis of selected candidate splicing variants in *COL4A5***表 S3.** 筛选出的 *COL4A5* 基因候选剪接的 DeepCLIP 分析

剪接因子	模型 ID	野生型序列	野生型评分	变异	变异序列	变异评分	Δ 评分 ^a
SRSF1	RNCMPT00106_RNCMPT	CCCAGGTATGAAG	0.22	c.465G>A	CCCAGGTATGAAA	0.24	0.02
SRSF1	RNCMPT00107_RNCMPT	CCCAGGTATGAAG	0.74	c.465G>A	CCCAGGTATGAAA	0.68	-0.06
SRSF1	RNCMPT00108_RNCMPT	CCCAGGTATGAAG	0.45	c.465G>A	CCCAGGTATGAAA	0.16	-0.29
SRSF1	RNCMPT00109_RNCMPT	CCCAGGTATGAAG	0.63	c.465G>A	CCCAGGTATGAAA	0.5	-0.13
SRSF1	RNCMPT00110_RNCMPT	CCCAGGTATGAAG	0.26	c.465G>A	CCCAGGTATGAAA	0.19	-0.07
SRSF1	RNCMPT00163_RNCMPT	CCCAGGTATGAAG	0.51	c.465G>A	CCCAGGTATGAAA	0.46	-0.05
SRSF2	RNCMPT00072_RNCMPT	CCCAGGTATGAAG	0.72	c.465G>A	CCCAGGTATGAAA	0.67	-0.05
SRSF7	RNCMPT00073_RNCMPT	CCCAGGTATGAAG	0.13	c.465G>A	CCCAGGTATGAAA	0.11	-0.02
SRSF9	RNCMPT00067_RNCMPT	CCCAGGTATGAAG	0.25	c.465G>A	CCCAGGTATGAAA	0.22	-0.03
HNRNPL	RNCMPT00027_RNCMPT	CCCAGGTATGAAG	0.13	c.465G>A	CCCAGGTATGAAA	0.14	0.01
HNRNPA1	HNRNPA1_BRUUN	CCCAGGTATGAAG	0.58	c.465G>A	CCCAGGTATGAAA	0.4	-0.18
HNRNPA2B1	RNCMPT00024_RNCMPT	CCCAGGTATGAAG	0.18	c.465G>A	CCCAGGTATGAAA	0.13	-0.05
SRSF1	RNCMPT00106_RNCMPT	ACAAAGGAGAGTTG	0.99	c.1683A>T	ACAAAGGTGAGTTG	0.12	-0.87
SRSF1	RNCMPT00107_RNCMPT	ACAAAGGAGAGTTG	0.99	c.1683A>T	ACAAAGGTGAGTTG	0.66	-0.33
SRSF1	RNCMPT00108_RNCMPT	ACAAAGGAGAGTTG	0.98	c.1683A>T	ACAAAGGTGAGTTG	0.34	-0.64
SRSF1	RNCMPT00109_RNCMPT	ACAAAGGAGAGTTG	0.97	c.1683A>T	ACAAAGGTGAGTTG	0.71	-0.26

续表

SRSF1	RNCMPT00110_RNCMPT	ACAAAGGAGAGTTG	0.96	c.1683A>T	ACAAAGGTGAGTTG	0.58	-0.38
SRSF1	RNCMPT00163_RNCMPT	ACAAAGGAGAGTTG	0.79	c.1683A>T	ACAAAGGTGAGTTG	0.53	-0.26
SRSF2	RNCMPT00072_RNCMPT	ACAAAGGAGAGTTG	0.99	c.1683A>T	ACAAAGGTGAGTTG	0.99	0
SRSF7	RNCMPT00073_RNCMPT	ACAAAGGAGAGTTG	0.76	c.1683A>T	ACAAAGGTGAGTTG	0.59	-0.17
SRSF9	RNCMPT00067_RNCMPT	ACAAAGGAGAGTTG	0.93	c.1683A>T	ACAAAGGTGAGTTG	0.57	-0.36
HNRNPL	RNCMPT00027_RNCMPT	ACAAAGGAGAGTTG	0.82	c.1683A>T	ACAAAGGTGAGTTG	0.64	-0.18
HNRNPA1	HNRNPA1_BRUUN	ACAAAGGAGAGTTG	0.63	c.1683A>T	ACAAAGGTGAGTTG	0.46	-0.17
HNRNPA2B1	RNCMPT00024_RNCMPT	CCACCAGGACTCCAG	0.93	c.3942G>A	CCACCAGGACTCCAA	0.63	-0.3
SRSF1	RNCMPT00106_RNCMPT	CCACCAGGACTCCAG	0.99	c.3942G>A	CCACCAGGACTCCAA	0.99	0
SRSF1	RNCMPT00107_RNCMPT	CCACCAGGACTCCAG	0.92	c.3942G>A	CCACCAGGACTCCAA	0.89	-0.03
SRSF1	RNCMPT00108_RNCMPT	CCACCAGGACTCCAG	0.98	c.3942G>A	CCACCAGGACTCCAA	0.97	-0.01
SRSF1	RNCMPT00109_RNCMPT	CCACCAGGACTCCAG	0.78	c.3942G>A	CCACCAGGACTCCAA	0.72	-0.06
SRSF1	RNCMPT00110_RNCMPT	CCACCAGGACTCCAG	0.92	c.3942G>A	CCACCAGGACTCCAA	0.88	-0.04
SRSF1	RNCMPT00163_RNCMPT	CCACCAGGACTCCAG	0.45	c.3942G>A	CCACCAGGACTCCAA	0.44	-0.01
SRSF2	RNCMPT00072_RNCMPT	CCACCAGGACTCCAG	0.02	c.3942G>A	CCACCAGGACTCCAA	0.02	0
SRSF7	RNCMPT00073_RNCMPT	CCACCAGGACTCCAG	0.5	c.3942G>A	CCACCAGGACTCCAA	0.43	-0.07
SRSF9	RNCMPT00067_RNCMPT	CCACCAGGACTCCAG	0.87	c.3942G>A	CCACCAGGACTCCAA	0.86	-0.01
HNRNPL	RNCMPT00027_RNCMPT	CCACCAGGACTCCAG	0.5	c.3942G>A	CCACCAGGACTCCAA	0.62	0.12
HNRNPA1	HNRNPA1_BRUUN	CCACCAGGACTCCAG	0.2	c.3943G>A	CCACCAGGACTCCAA	0.17	-0.03
HNRNPA2B1	RNCMPT00024_RNCMPT	CCACCAGGACTCCAG	0.09	c.3944G>A	CCACCAGGACTCCAA	0.07	-0.02
SRSF1	RNCMPT00106_RNCMPT	CTCCTACAGCTTTTGG	0.003	c.4953C>T	CTCCTATAGCTTTTGG	0.002	-0.001
SRSF1	RNCMPT00107_RNCMPT	CTCCTACAGCTTTTGG	0.006	c.4953C>T	CTCCTATAGCTTTTGG	0.006	0
SRSF1	RNCMPT00108_RNCMPT	CTCCTACAGCTTTTGG	0.005	c.4953C>T	CTCCTATAGCTTTTGG	0.002	-0.003
SRSF1	RNCMPT00109_RNCMPT	CTCCTACAGCTTTTGG	0.02	c.4953C>T	CTCCTATAGCTTTTGG	0.1	0.08
SRSF1	RNCMPT00110_RNCMPT	CTCCTACAGCTTTTGG	0.16	c.4953C>T	CTCCTATAGCTTTTGG	0.1	-0.06
SRSF1	RNCMPT00163_RNCMPT	CTCCTACAGCTTTTGG	0.32	c.4953C>T	CTCCTATAGCTTTTGG	0.33	0.01
SRSF2	RNCMPT00072_RNCMPT	CTCCTACAGCTTTTGG	0.05	c.4953C>T	CTCCTATAGCTTTTGG	0.1	0.05
SRSF7	RNCMPT00073_RNCMPT	CTCCTACAGCTTTTGG	0.63	c.4953C>T	CTCCTATAGCTTTTGG	0.08	-0.55
SRSF9	RNCMPT00067_RNCMPT	CTCCTACAGCTTTTGG	0.15	c.4953C>T	CTCCTATAGCTTTTGG	0.1	-0.05
HNRNPL	RNCMPT00027_RNCMPT	CTCCTACAGCTTTTGG	0.59	c.4953C>T	CTCCTATAGCTTTTGG	0.21	-0.38
HNRNPA1	HNRNPA1_BRUUN	CTCCTACAGCTTTTGG	0.38	c.4953C>T	CTCCTATAGCTTTTGG	0.59	0.21
HNRNPA2B1	RNCMPT00024_RNCMPT	CTCCTACAGCTTTTGG	0.02	c.4953C>T	CTCCTATAGCTTTTGG	0.1	0.08

^aΔ 评分: 变异评分与野生型评分的差值, 负值表示变异导致剪接因子与基因序列的结合力下降, 正值表示结合力增强。