

# FANCL 新突变 (c.1033G>A) 致早发性卵巢功能不全 1 例报道及体外功能验证

刘怡箐<sup>1</sup> 任淑婷<sup>1</sup> 潘韵程<sup>1</sup> 张 锋<sup>2</sup> 张晓金<sup>2</sup> 吴燕华<sup>1,3Δ</sup>

(<sup>1</sup>复旦大学生命科学学院遗传学系, <sup>3</sup>生物科学国家级实验教学示范中心 上海 200433;

<sup>2</sup>复旦大学附属妇产科医院妇科 上海 200011)

**【摘要】** 目的 探究一例早发性卵巢功能不全 (premature ovarian insufficiency, POI) 患者中发现的 FANCL 新突变的特点,并在体外研究其对功能的影响。方法 利用全外显子组测序 (whole-exome sequencing, WES) 技术,在一例 POI 患者中筛选到了新的 FANCL 杂合突变 c.1033G>A (p.Glu345Lys), 家系回访发现该突变遗传自早绝经的母亲。通过 sanger 测序鉴定该突变真实性,并通过软件预测突变位点的保守性。构建过表达 FANCL 突变型和野生型质粒,瞬时转染进 HEK293T 细胞株,通过 qPCR、免疫荧光和 Western blot 来检测突变产生的影响。结果 该突变位于 FANCL 的环状结构域内且在多物种中高度保守。突变体 mRNA 表达水平没有明显变化,而蛋白质表达水平显著下调。体外细胞实验进一步揭示该变异会通过降低蛋白质稳定性导致表达水平下降。结论 该 POI 患者存在 FANCL c.1033G>A 变异,并引起蛋白质稳定性下降而导致患者患病。

**【关键词】** 早发性卵巢功能不全 (POI); FANCL; 全外显子组测序 (WES); 错义突变; 蛋白质稳定性

**【中图分类号】** R394 **【文献标志码】** A **doi:**10.3969/j.issn.1672-8467.2025.02.014

## A case report of premature ovarian insufficiency caused by a novel FANCL mutation (c.1033G>A) and *in vitro* functional validation

LIU Yi-qing<sup>1</sup>, REN Shu-ting<sup>1</sup>, PAN Yun-cheng<sup>1</sup>, ZHANG Feng<sup>2</sup>, ZHANG Xiao-jin<sup>2</sup>, WU Yan-hua<sup>1,3Δ</sup>

(<sup>1</sup>Department of Genetics, <sup>3</sup>National Demonstration Center for Experimental Biology Education, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China; <sup>2</sup>Department of Gynecology, Obstetrics and Gynecology Hospital, Fudan University, Shanghai 200011, China)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the characteristics of a novel FANCL mutation identified in a patient with premature ovarian insufficiency (POI) and to explore its potential functional impacts *in vitro*. **Methods** A novel FANCL heterozygous mutation c.1033G>A (p.Glu345Lys) was screened in a patient with POI using whole exome sequencing (WES), which was found to be inherited from a mother who had undergone early menopause. The authenticity of the mutation was identified by Sanger sequencing and the conserved nature of the mutation site was predicted by software. Overexpressing FANCL mutant and wildtype plasmids were constructed and transiently transfected into HEK293T cell lines, and the effect of the mutation was detected by qPCR, immunofluorescence and Western blot. **Results** The mutation site of FANCL was located within the Ring domain of FANCL, which was highly conserved across multiple species. The mutant showed no significant change in mRNA expression level, while the protein expression level was significantly down-regulated. *In vitro* cellular experiments further revealed that the mutation leads

国家重点研发计划(2022YFC2703800);国家自然科学基金(32270658)

<sup>Δ</sup>Corresponding author E-mail: yanhuawu@fudan.edu.cn

网络首发时间:2025-03-05 18:25:10 网络首发地址:https://link.cnki.net/urlid/31.1885.R.20250303.1658.012

to decreased expression levels by reducing protein stability. **Conclusion** A *FANCL* c. 1033G>A mutation was found and it may cause disease in the POI patient due to decreased protein stability.

**【Key words】** premature ovarian insufficiency (POI); *FANCL*; whole exome sequencing (WES); missense mutation; protein stability

\* This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFC2703800) and the National Natural Science Foundation of China (32270658).

早发性卵巢功能不全 (premature ovarian insufficiency, POI) 是指女性在 40 岁之前卵巢功能减退, 症状涵盖了月经紊乱、促性腺激素浓度升高及雌二醇浓度下降, 并出现原发性或继发性绝经<sup>[1]</sup>。POI 患者面临丧失生育能力的风险, 或者因为缺乏雌激素出现绝经期症状。同时, POI 可能导致患者罹患心血管疾病和骨质疏松的风险升高, 年轻患者出现低自尊心, 产生焦虑和抑郁的情况<sup>[2]</sup>, 极大影响患者的生活质量和身心健康。

POI 的发病率为 1%~4%, 已成为我国育龄女性不孕的重要原因之一。了解 POI 的病因对其临床诊断和治疗有重要意义。卵泡储备不足、卵泡成熟异常以及卵泡储备被过早消耗都会引起 POI<sup>[3]</sup>。常见的 POI 诱因包括: 遗传因素、自身免疫性疾病、医源性损伤及环境因素等<sup>[4]</sup>。值得注意的是, 目前仍有将近 50% 的 POI 患者具体病因尚不明确<sup>[5]</sup>。

在 POI 的病因中, 遗传因素占据重要地位, 占 20%~25%。大量研究显示, POI 有家族倾向, 10%~30% 的 POI 病例其一级亲属也患病<sup>[6]</sup>。迄今为止, POI 致病基因被鉴定和研究的已有 95 个, 这些基因有害性遗传变异可能会导致 POI<sup>[7]</sup>。多条生物学途径中都可以发现这些基因, 如性腺发育、卵泡发育、DNA 复制与损伤修复、减数分裂等<sup>[8]</sup>。越来越多的 DNA 修复相关基因在探索 POI 病因的过程中备受关注。

DNA 链间交联 (interstrand crosslink, ICL) 作为 DNA 损伤中最具破坏性的形式之一, 其修复难度极大, 特别是在 DNA 复制过程中显得尤为棘手<sup>[9]</sup>。哺乳动物细胞中, ICL 修复主要由范可尼贫血 (Fanconi anemia, FA) 途径介导。其中, FA 核心复合物作为一种独特的多亚基 E3 泛素连接酶复合物, 由 8 个亚基组成 (FANCA、B、C、E、F、G、L 和 FAAP100)<sup>[10]</sup>, 在复制和 DNA 损伤依赖机制中被激活, 并单泛素化下游 FANCI-D2 异二聚体, 结合到损伤部位招募下游效应因子, 通过核苷酸切除修复

和同源重组实现 ICL 修复。

*FANCL* 编码泛素连接酶, 该酶是 FA 核心复合物的成员, 与 FANCT/UBE2T 合作促进 FANCI-D2 异二聚体的泛素化。此外, 近年来的研究还揭示 *FANCL* 可能是雌性动物胚胎阶段原始生殖细胞 (primordial germ cell, PGC) 增殖所必需的<sup>[11]</sup>。*Fancl*<sup>-/-</sup> 小鼠在生殖方面出现显著缺陷, 胚胎发育过程中 PGC 的增殖减少, 成年雌鼠出现 POI 样表型<sup>[12]</sup>。此外, 敲除斑马鱼中的 *fancl* 后, 其生殖细胞凋亡, 性别从雌性到雄性发生逆转<sup>[13]</sup>。

2020 年, 研究者首次在 POI 患者中报道了 *FANCL* 的致病性遗传变异——杂合移码突变 p.Gln350Valfs\*18 和 p.Met247Asnfs\*4<sup>[14]</sup>。本研究借助全外显子组测序 (whole exome sequencing, WES) 技术, 结合遗传分析, 成功在 1 例 POI 患者中发现了一个新颖的 *FANCL* 杂合错义突变 p.Glu345Lys。进一步通过 Sanger 测序、家系回访、生物信息学分析和体外细胞实验, 揭示该变异会损害蛋白质稳定性, 为丰富 *FANCL* 致病机制提供了新的实验依据。

## 资料和方法

**研究对象、WES 和数据处理** POI 患者由复旦大学附属妇产科医院门诊收集, 患者出现至少 4 个月月经稀发或者闭经以及 2 次异常血清基础卵泡刺激素 (follicle stimulating hormone, FSH) > 25 IU/L<sup>[1]</sup>, 并且未接受过卵巢手术、放射治疗或化疗干预。本研究通过了复旦大学生命科学学院伦理委员会 (批准号: FE22050R) 批准, 患者签署了知情同意书, 并完全了解本研究内容, 自愿加入本实验室研究队列。WES 的数据处理与分析与实验室前期工作流程一致<sup>[15]</sup>, 用于鉴定和 Sanger 测序的引物正向序列为 5'-CCTCCACCTCGGGTAAACCT-3', 反向序列为 5'-ACTTGACGGTACCATTCTGAT-3'。使用金牌 Mix (北京擎科生物科技股份有限公司) 进

行PCR扩增目的片段,产物经琼脂糖凝胶电泳确认后,进行Sanger测序,使用SnapGene软件查看并分析测序结果。

**质粒构建和诱变** 合成了人类全长*FANCL* cDNA(上海吉凯基因医学科技股份有限公司)并构建到pCMV-Flag载体中。按照KOD-Plus-Mutagenesis试剂盒(日本东洋纺株式会社)的流程,进行定点诱变以产生*FANCL*的错义突变(E345K)。质粒在功能研究前进行全长测序进行验证。

**细胞培养与转染** HEK293T细胞购自中国科学院细胞库。HEK293T细胞在补充有10% FBS(美国Gibco公司)和1%青霉素-链霉素(P/S)抗生素混合物的DMEM(美国Gibco公司)中培养,培养条件为37℃和5% CO<sub>2</sub>。使用GP-transfect-Mate转染试剂(苏州吉玛基因股份有限公司)将*FANCL*质粒与pCMV-Flag空载体(日本Takara Standard株式会社)共转染到HEK293T细胞中。在蛋白稳定性实验中,分别在转染后40、42、44、46、48 h将100 μg/mL环己酰亚胺(cycloheximide, CHX)加入培养基中。

**实时定量PCR** 从细胞中提取总RNA,根据制造商的说明使用PrimeScript™ RT试剂盒(日本Takara Standard株式会社)进行逆转录得到cDNA,使用SYBR Green进行实时定量PCR。*FANCL*的引物序列如下:正向序列为5'-CCTGTTCCATT TGTGCTCC-3',反向序列为5'-CCACATGG TCAGCTCCAAGA-3'。以*ACTB*为内参基因,正向序列为5'-CTCGCCTTTGCCGATCC-3',反向序列为5'-GGTACTTCAGGGTGAGGATGC-3'。采用2<sup>-ΔΔCT</sup>法进行基因相对表达水平的分析<sup>[16]</sup>。

**Western blot** 从细胞中提取全细胞裂解液,通过10%的SDS-PAGE进行分离并转移到PVDF膜(美国Sigma-Aldrich公司)上。用5%的脱脂牛奶封闭后,将Flag抗体(1:3 000稀释,美国Sigma-Aldrich公司)或β-actin抗体(1:10 000,美国Proteintech Group公司)4℃孵育过夜,然后与HRP偶联的二抗孵育1 h,使用增强型化学发光试剂盒(美国Bio-Rad公司)检测,利用化学发光成像仪(中国基因有限公司)获取图像。

**细胞荧光** 将HEK293T细胞接种在盖玻片上,转染后48 h移除培养基,用4%多聚甲醛固定,并用0.2% Triton进行透化。用5% BSA封闭1 h

后,加入Flag抗体(1:200稀释,美国Sigma-Aldrich公司)4℃孵育过夜。洗涤后加入荧光偶联的Alexa Fluor 488山羊抗小鼠IgG(1:400稀释;美国Thermo Fisher公司)37℃孵育45 min,期间加入Hoechst 33258(美国Sigma-Aldrich公司)反应15 min。洗涤后封片,荧光显微镜观察。

**统计学分析** 定量数据使用Excel 2019MSO进行分析和处理,采用Student's *t*检验进行统计分析。*P*<0.05为差异有统计学意义。

## 结 果

**POI患者的临床病理信息** 该POI患者1985年出生,身高155 cm,体重50 kg,12岁初潮,从2019年开始出现月经失调,无其他既往病史,末次月经时间为2021年11月。2019年8月测得其FSH水平为27.55 IU/L,2020年7月测得其FSH水平为30.08 IU/L。两次测量水平均高于25 IU/L,患者被诊断为继发性POI。B超检查其双侧卵巢偏小,且未发现明显卵泡。2021年9月测得FSH水平为28.41 IU/L,促黄体生成素水平为10.49 IU/L,雌二醇水平为11 ng/mL,右卵巢大小为15 mm×15 mm×10 mm,左卵巢大小为14 mm×11 mm×9 mm。父母均体格健康,母亲40岁前绝经,为早绝经患者。

**WES与遗传变异分析** 从患者外周血提取的gDNA,经Nanodrop分析,其浓度大于50 ng/μL,吸光度A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>为1.844, A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub>为2.362,质量较高。

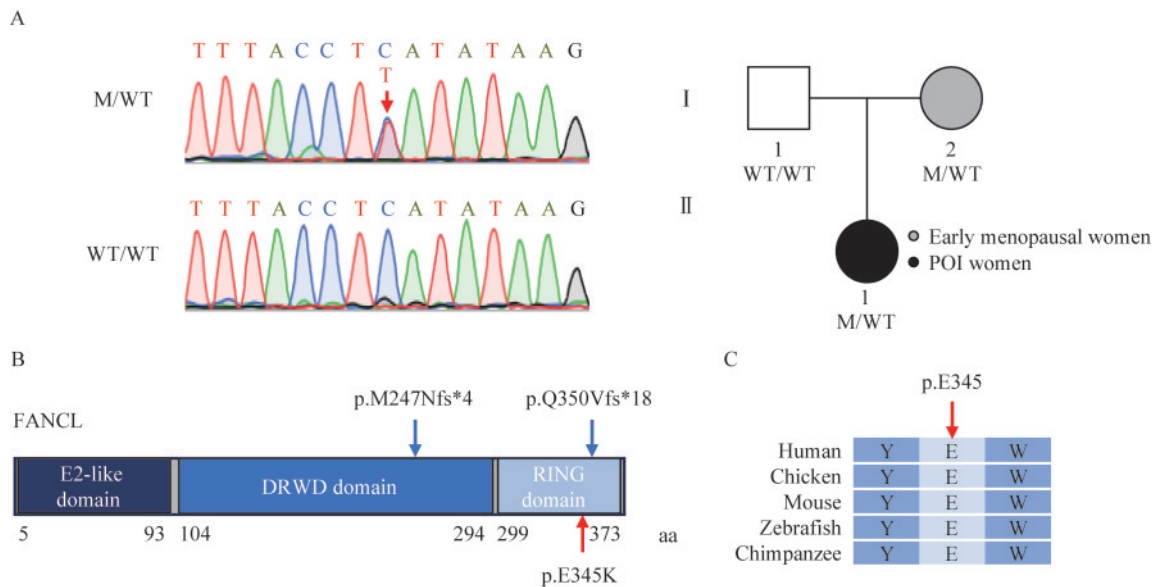
对先证者进行全外显子组测序及数据分析,详细的分析流程见实验室前期工作<sup>[15]</sup>。简而言之,首先除去测序质量差的数据,保留外显子区域及剪接位点内的单核苷酸变异(single nucleotide variant, SNV)和短插入缺失(insertion and deletion, indel),随后去除同义突变。由于POI发病率为1%,遗传因素占POI病因的20%~25%且具有高度异质性,因此在本研究中最小的等位基因频率筛选阈值为1‰,即筛去千人基因组数据库(1000 Genome, 1KG)<sup>[17]</sup>、ExAC和gnomAD<sup>[18]</sup> 3个数据库东亚人群频率大于千分之一的位点。剩余的变异中,先保留功能丧失型突变(如无义突变、移码突变、剪接位点突变等),再利用SIFT<sup>[19]</sup>、PolyPhen-2<sup>[20]</sup>、MutationTaster<sup>[21]</sup>、CADD<sup>[22]</sup> 4种打分软件评价错义

突变的有害性,保留至少3个打分软件评估为有害的错义突变。最终,我们从先证者的WES数据中获得了94个候选变异。

将全部候选变异所在的基因进行文献检索与功能分析,包括POI患者的临床报道、动物模型和该基因的功能实验,综合评估每个遗传变异的致病可能性,最终发现一个已知POI致病基因的新变异,即FANCL c.1033G>A (p.Glu345Lys)。该变异在1KG、ExAC和gnomAD数据库东亚人群中频率为0,为新的FANCL变异,SIFT、Polyphen2, MutationTaster的有害性评估均为有害,CADD评分为7.842。

为排除WES结果假阳性,利用Sanger测序进行变异验证,针对突变位点,我们设计了用于

Sanger测序的引物,确定发现的FANCL的突变是真实存在的变异,测序结果如图1A所示。进一步对早绝经的母亲进行Sanger检验,发现母亲也携带了该错义突变,即FANCL的c.1033G>A变异与卵巢早衰表型呈现共分离(图1A)。FANCL蛋白包含3个功能域,N端的E2样结构域(E2-like domain)、一个双RWD折叠结构域(DRWD domain)和一个C端环状结构域(ring domain)。蛋白质分析结果显示(图1B),c.1033G>A突变导致蛋白质345位的谷氨酸变为赖氨酸,该突变位于FANCL蛋白质C端的环结构域内。此外,该氨基酸位点在斑马鱼、鸡、哺乳动物等中均保守(图1C)。



A: FANCL genotypes of POI patients and their parents (right). Sanger sequencing of the FANCL gene (left). WT: Wild-type; M: Mutant; Arrows indicate mutation sites. B: Structure of the FANCL protein. Blue arrows indicate previously reported mutation sites, and red arrows indicate mutation sites identified in this study. C: Conservation analysis of amino acids corresponding to FANCL mutation sites.

### 图1 在FANCL基因中鉴定出一个新的错义突变

#### Fig 1 One novel missense mutation was identified in the FANCL gene

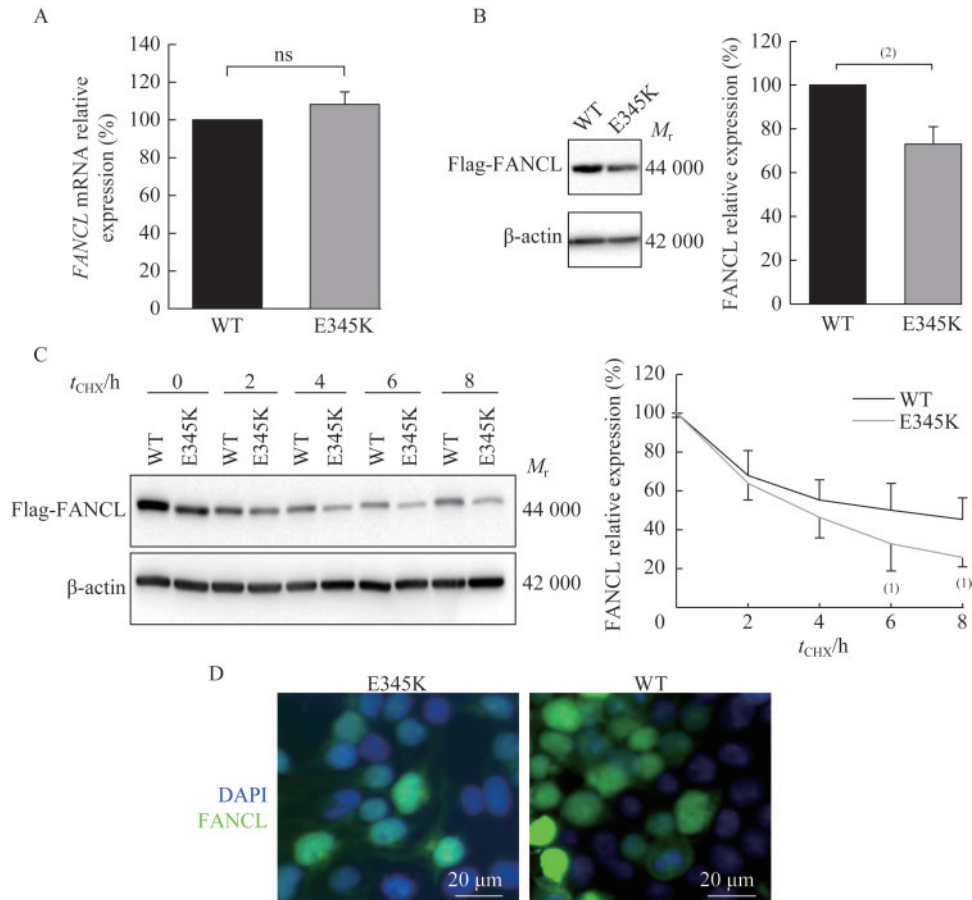
**FANCL c.1033G>A变异降低了FANCL蛋白质稳定性** 为了检验变异是否引起FANCL基因表达变化,首先构建FANCL野生型及突变型质粒。Flag-FANCL-WT质粒携带野生型FANCL基因的CDS全长,Flag-FANCL-p.E345K质粒携带了与患者一致的错义突变。

将2种质粒分别转入293T细胞株后进行荧光实时定量PCR实验。结果显示,突变组和野生组的mRNA表达无显著性差距(图2A),提示突变对

FANCL基因的mRNA表达无明显影响。进一步通过Western blot技术检测FANCL蛋白的表达水平,发现突变型的FANCL蛋白表达量相对于野生型蛋白显著下调(图2B)。为检验该变异如何影响蛋白质水平,我们利用CHX抑制蛋白质的合成,并检验目的蛋白的降解情况。如图2C所示,相对于野生型蛋白,随着时间的延长,突变蛋白质水平的下降幅度更大,存在显著性差异。以上结果证明患者携带的p.E345K错义突变可能通过降低FANCL蛋白质

的稳定性而影响基因的蛋白表达水平。此外, p. E345K 定位于 FANCL 蛋白质的 Ring 结构域中, 该结构域被报道与 FANCL 蛋白质入核有关<sup>[14]</sup>。为了检验该突变是否会影 FANCL 的核定位, 我们向

293T 细胞中导入 FANCL 野生型和突变型质粒, 结果发现尽管突变体的荧光强度也有下降, 但它的核定位能力没有受到明显影响(图 2D)。



A: Relative quantitative PCR analysis of mRNA expression levels of wild-type and mutant FANCL,  $n=4$ ; B: Western blot expression analysis of wild-type and mutant FANCL, with  $\beta$ -actin as an internal reference. Left: Representative Western blot plots; Right: Grey-scale statistical result plots,  $n=3$ . C: Stability analysis of wild-type and mutant FANCL proteins. Left: Representative Western blot plots; Right: Greyscale statistics result plots,  $n=3$ . <sup>(1)</sup> $P<0.05$ , <sup>(2)</sup> $P<0.01$ , ns: No significance. D: Subcellular localization of Flag-FANCL-E345K (left) and Flag-FANCL-WT (right) in HEK293T cells. Scale bar=20  $\mu$ m.

## 图2 突变型 FANCL 的基因表达水平与定位分析

Fig 2 Gene expression and localization analysis of mutant FANCL

## 讨 论

在探讨生殖细胞基因组稳定性的影响因素时, DNA 损伤被视为一个主要的胁迫因素。随着研究的不断深入, 越来越多的证据表明 DNA 修复相关基因突变和 POI 之间存在密切联系, 这已成为 POI 的重要遗传机制之一<sup>[23]</sup>。近年来, 包括本实验室在内的多个研究团队, 在 POI 遗传病因分析中揭示了多个涉及 DNA 损伤修复的基因<sup>[24-25]</sup>。其中, ICL 是

一种严重的 DNA 损伤形式, 阻碍了转录和复制过程<sup>[8]</sup>。ICL 修复主要依赖 FA 途径, 该途径中涉及的基因缺陷可导致雌性生殖细胞 ICL 修复功能受损, 进而延迟 DNA 损伤修复, 最终引发 POI<sup>[26]</sup>。

研究显示, 女性 FA 患者近一半不育<sup>[27]</sup>, 提示 POI 的发生可能与 FA 家族基因缺陷有关。目前, 参与 FA 通路的共有 22 个基因, 其中, FANCA、FANCC、FANCG、FANCL 以及 FANCM 已被确定为 POI 致病基因<sup>[7]</sup>。FANCA 编码蛋白主要参与 FA 核心复合物在细胞核中的定位, 以及减数分裂

期间的ICL修复<sup>[28]</sup>。本研究团队前期在56名中国POI女性中发现2例FANCA杂合错义突变c.1772G>A和c.3887A>G,这2种突变可降低蛋白表达水平,并在杂合敲除雌鼠模型中观察到随年龄增长出现生育力降低和卵泡数量减少的现象<sup>[29]</sup>。2017年Fouquet等<sup>[30]</sup>首次报道FANCM纯合移码突变c.5101C>T(p.Gln1701)导致POI,可能是因为FANCM突变破坏了基因组的稳定性,引发卵母细胞减数分裂缺陷以及凋亡。随后,其他研究团队在2例法国患者中分别发现了新的FANCM无义突变c.3088C>T和c.5791C>T<sup>[31]</sup>。

FANCL作为一种E3泛素连接酶,参与FA复合物的组成,与UBE2T相互作用,促进FANCI-D2复合物的单泛素化,从而有助于ICL修复<sup>[32]</sup>。FANCL双等位基因突变可导致典型的FA表型,包括发育异常、肿瘤易感性和生育缺陷等<sup>[33]</sup>。另一方面,Fancl纯合敲除小鼠模型只表现出生殖缺陷,fancl纯合敲除斑马鱼模型出现生殖细胞凋亡和性别逆转,进一步提示了FANCL在生殖细胞的发育的重要性。

2020年,已有学者报道了FANCL的杂合移码突变p.Gln350Valfs\*18和p.Met247Asnfs\*4与POI的发生有关<sup>[14]</sup>。这2个突变分别位于环状结构域和DRWD结构域,都会导致翻译过早终止产生截短蛋白。p.Met247Asnfs\*4突变还会使整个环状结构域被消除。这2种突变都破坏了FANCL的结构域,影响了FANCL的核定位信号,使突变蛋白无法进入细胞核,保留在细胞质中。同时,这2种突变都损害了FANCL蛋白的泛素连接酶活性和DNA修复能力。研究人员认为这2种杂合突变导致单倍体剂量不全,损害了DNA修复,这可能会减少PGCs增殖和/或过早消耗卵巢中大量原始卵泡卵母细胞,最终诱发POI。

在本研究中,我们发现了一个新的FANCL错义变异c.1033G>A,这一变异可能通过影响蛋白质的稳定性而损害FANCL的功能。目前,已知FANCL可以直接促进FANCI-FANCD2的相互作用,并通过其环状结构域优先结合UBE2T,其中FANCL的残基Ile309、Trp341和Tyr311对FANCL-UBE2T互相作用很重要<sup>[34-35]</sup>。FANCL能够对UBE2T进行变构激活,优化了E2的活性位点,以便驱动FANCD2位点特异性泛素化<sup>[36]</sup>。在体

外,分离纯化的FANCL和UBE2T能够催化FANCD2的单泛素化<sup>[34]</sup>。鉴于本研究发现的p.Glu345Lys错义突变位于FANCL与UBE2T互作的环状结构域中,我们推测该变异可能也会影响FANCL对FANCI-D2复合物的单泛素化水平,但这一猜想还有待深入的研究加以检验。

本例患者只进行了体外细胞实验,未进行动物层面的研究。如能构建携带该突变的小鼠模型,将有助于进一步检验该变异的有害性,并深入分析FANCL突变的致病机制。

综上,本研究在一对POI母女对中首次报道了一个新颖的FANCL有害遗传变异c.1033G>A,为进一步丰富FANCL致病机制提供了新的实验依据,同时也为POI的早期诊断和风险预警提供了新的理论依据。

**作者贡献声明** 刘怡箐 实验操作,数据统计和分析,论文构思和撰写。任淑婷 患者入组,细胞培养,数据分析。潘韵程 细胞培养,数据分析。张锋 论文构思,数据分析。张晓金 患者诊断,论文修改。吴燕华 数据分析,论文构思和修订。

**利益冲突声明** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## 参 考 文 献

- [1] EUROPEAN SOCIETY FOR HUMAN REPRODUCTION AND EMBRYOLOGY (ESHRE) GUIDELINE GROUP ON POI, WEBBER L, DAVIES M, *et al.* ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency [J]. *Hum Reprod*, 2016, 31(5):926-937.
- [2] FENTON AJ. Premature ovarian insufficiency: pathogenesis and management [J]. *J Midlife Health*, 2015, 6(4):147-153.
- [3] VAN KASTEREN YM, HUNDSCHIED RD, SMITS AP, *et al.* Familial idiopathic premature ovarian failure: an overrated and underestimated genetic disease? [J]. *Hum Reprod*, 1999, 14(10):2455-2459.
- [4] FRANCUCCI CM, ROMAGNI P, CAMILLETTI A, *et al.* Effect of natural early menopause on bone mineral density [J]. *Maturitas*, 2008, 59(4):323-328.
- [5] VUJOVIC S. Aetiology of premature ovarian failure [J]. *Menopause Int*, 2009, 15(2):72-75.
- [6] CHAPMAN C, CREE L, SHELLING AN. The genetics

- of premature ovarian failure: current perspectives [J]. *Int J Womens Health*, 2015, 7: 799-810.
- [ 7 ] KE H, TANG S, GUO T, *et al.* Landscape of pathogenic mutations in premature ovarian insufficiency [J]. *Nat Med*, 2023; 29(2): 483-492.
- [ 8 ] JIAO X, KE H, QIN Y, *et al.* Molecular genetics of premature ovarian insufficiency [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2018, 29(11): 795-807.
- [ 9 ] GARTNER A, ENGBRECHT J. DNA repair, recombination, and damage signaling [J]. *Genetics*, 2022, 220(2): iyab178.
- [10] SHAKEEL S, RAJENDRA E, ALCON P, *et al.* Structure of the Fanconi anaemia monoubiquitin ligase complex [J]. *Nature*, 2019, 575(7781): 234-237.
- [11] ZHAO QG, LU BS, HUANG PT. Functions of FANCL in primordial germ cell formation and Fanconi anemia [J]. *Yi Chuan Xue Bao*, 2005, 32(9): 993-1000.
- [12] AGOULNIK AI, LU B, ZHU Q, *et al.* A novel gene, Pog, is necessary for primordial germ cell proliferation in the mouse and underlies the germ cell deficient mutation, gcd [J]. *Hum Mol Genet*, 2002, 11(24): 3047-3053.
- [13] RAMANAGOUDR-BHOJAPPA R, CARRINGTON B, RAMASWAMI M, *et al.* Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated knockout of 19 Fanconi anemia pathway genes in zebrafish revealed their roles in growth, sexual development and fertility [J]. *PLoS Genet*, 2018, 14(12): e1007821.
- [14] YANG Y, GUO T, LIU R, *et al.* FANCL gene mutations in premature ovarian insufficiency [J]. *Hum Mutat*, 2020, 41(5): 1033-1041.
- [15] WANG Q, LI D, CAI B, *et al.* Whole-exome sequencing reveals SALL4 variants in premature ovarian insufficiency: an update on genotype-phenotype correlations [J]. *Hum Genet*, 2019, 138(1): 83-92.
- [16] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [17] GENOMES PROJECT C, ABECASIS G R, AUTON A, *et al.* An integrated map of genetic variation from 1, 092 human genomes [J]. *Nature*, 2012, 491(7422): 56-65.
- [18] LEK M, KARCZEWSKI KJ, MINIKEL EV, *et al.* Analysis of protein-coding genetic variation in 60, 706 humans [J]. *Nature*, 2016, 536(7616): 285-291.
- [19] KUMAR P, HENIKOFF S, NG PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(7): 1073-1081.
- [20] ADZHUBEI IA, SCHMIDT S, PESHKIN L, *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations [J]. *Nat Methods*, 2010, 7(4): 248-249.
- [21] SCHWARZ JM, COOPER DN, SCHUELKE M, *et al.* MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age [J]. *Nat Methods*, 2014, 11(4): 361-362.
- [22] KIRCHER M, WITTEN DM, JAIN P, *et al.* A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants [J]. *Nat Genet*, 2014, 46(3): 310-315.
- [23] HUHTANIEMI I, HOVATTA O, LA MARCA A, *et al.* Advances in the molecular pathophysiology, genetics, and treatment of primary ovarian insufficiency [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2018, 29(6): 400-419.
- [24] ZHOU Z, YANG X, PAN Y, *et al.* Temporal transcriptomic landscape of postnatal mouse ovaries reveals dynamic gene signatures associated with ovarian aging [J]. *Hum Mol Genet*, 2021, 30(21): 1941-1954.
- [25] KE H, TANG S, GUO T, *et al.* Landscape of pathogenic mutations in premature ovarian insufficiency [J]. *Nat Med*, 2023, 29(2): 483-492.
- [26] ZHAO J, ZHANG Y, LI W, *et al.* Research progress of the Fanconi anemia pathway and premature ovarian insufficiency dagger [J]. *Biol Reprod*, 2023, 109(5): 570-585.
- [27] TSUI V, CRISMANI W. The fanconi anemia pathway and fertility [J]. *Trends Genet*, 2019, 35(3): 199-214.
- [28] GARCIA-HIGUERA I, KUANG Y, DENHAM J, *et al.* The fanconi anemia proteins FANCA and FANCG stabilize each other and promote the nuclear accumulation of the Fanconi anemia complex [J]. *Blood*, 2000, 96(9): 3224-3230.
- [29] YANG X, ZHANG X, JIAO J, *et al.* Rare variants in FANCA induce premature ovarian insufficiency [J]. *Hum Genet*, 2019, 138(11-12): 1227-1236.
- [30] FOUQUET B, PAWLIKOWSKA P, CABURET S, *et al.* A homozygous FANCM mutation underlies a familial case of non-syndromic primary ovarian insufficiency [J]. *Elife*, 2017, 6: e30490.
- [31] JAILLARD S, BELL K, AKLOUL L, *et al.* New insights into the genetic basis of premature ovarian insufficiency: novel causative variants and candidate genes revealed by genomic sequencing [J]. *Maturitas*, 2020, 141: 9-19.
- [32] VAN TWEST S, MURPHY VJ, HODSON C, *et al.* Mechanism of ubiquitination and deubiquitination in the fanconi anemia pathway [J]. *Mol Cell*, 2017, 65(2): 247-259.