

珊瑚状先天性白内障一家系致病基因筛查与鉴定

巩雪, 宋籽浔, 肖伟

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 30973276); 辽宁省教育厅科学研究项目(No. L:2015593)
作者单位:(110004) 中国辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属盛京医院眼科
作者简介:巩雪, 在读硕士研究生, 研究方向: 白内障。
通讯作者:肖伟, 医学博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 白内障. xiaow@sj-hospital.org
收稿日期:2015-09-29 **修回日期:**2016-01-15

Gene mapping and analysis of genes in a Chinese family with congenital coralliform cataract

Xue Gong, Zi-Xun Song, Wei Xiao

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 30973276); Scientific Research Project of Liaoning Education Department (No. L:2015593)
Department of Ophthalmology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Correspondence to: Wei Xiao. Department of Ophthalmology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. xiaow@sj-hospital.org
Received:2015-09-29 **Accepted:**2016-01-15

Abstract

• **AIM:** To detect the causative mutation for congenital coralliform cataracts in a Chinese family.
• **METHODS:** Peripheral blood samples were collected and genomic DNA was extracted. We chose four candidate genes associated with congenital coralliform cataract including GJA3, GJA8, CRYGC and CRYGD. After genomic polymerase chain reaction (PCR) performed, we sequenced the coding exons and their flanking intronic sequences of four candidate genes.
• **RESULTS:** We ascertained a three-generation Chinese family with autosomal dominant coralliform congenital cataracts. Mutation screenings were performed for all four candidate genes, and a heterozygous variant, c. 70C>A, was identified in exon 2 of CRYGD.
• **CONCLUSION:** Our result demonstrates that a heterozygous mutation of CRYGD is responsible for the autosomal dominant congenital coralliform cataract in a three-generation Chinese pedigree.
• **KEYWORDS:** coralliform cataract; gamma-D crystallin gene; gene sequencing

Citation: Gong X, Song ZX, Xiao W. Gene mapping and analysis of genes in a Chinese family with congenital coralliform cataract. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2016;16(2):346-348

摘要

目的: 对一个珊瑚状先天性白内障家系进行致病基因的筛查。
方法: 采集家系中2例患者和1例正常对照者的外周静脉血, 提取基因组DNA。选择与珊瑚状白内障相关的候选基因GJA3、GJA8、CRYGC及CRYGD设计引物, 进行聚合酶链反应(PCR)扩增候选基因, 并对扩增片段进行Sanger测序。
结果: 该家系疾病表型为珊瑚状白内障, 呈常染色体显性遗传。通过对扩增产物测序, 发现家系内患者CRYGD第2个外显子第70位有1个C>A碱基的杂合突变(c. 70C>A), 正常对照未见该点突变。
结论: CRYGD基因的错义突变c. 70C>A是该珊瑚状白内障家系的致病原因。
关键词: 珊瑚状白内障; CRYGD; 基因测序
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.2.40

引用: 巩雪, 宋籽浔, 肖伟. 珊瑚状先天性白内障一家系致病基因筛查与鉴定. *国际眼科杂志* 2016;16(2):346-348

0 引言

先天性白内障(congenital cataract)是指出生时或出生后1a之内发生的晶状体混浊, 可为家族性或散发性, 可伴发或不伴发其他眼部异常或系统疾病。先天性白内障是造成儿童弱视或失明的主要原因。目前, 先天性白内障发病率约为0.01%~0.06%^[1]。遗传、病毒感染、药物和放射线照射、全身疾病等各种影响胎儿晶状体发育的因素都可导致白内障, 其中约1/3的先天性白内障与遗传因素有关。本研究对东北辽沈地区一个特殊表型的珊瑚状白内障家系的致病基因进行筛查与鉴定, 以期找到致病基因及位点。

1 对象和方法

1.1 对象 本试验经中国医科大学伦理委员会批准后, 我们收集了一个来自中国东北辽沈地区的三代先天性白内障家系, 经详细的家系病史调查, 绘制系谱图后确定遗传方式为常染色体显性遗传。我们对全部家庭成员进行详细的眼部检查, 包括裂隙灯检查、视力、验光、眼压、眼底检查。我们收集3例家系成员(Ⅱ1, Ⅱ2, Ⅲ1)静脉血各5mL于EDTA抗凝真空管内, -20℃保存。

1.2 方法 选取候选基因: 检索OMIM数据库, 选取了4个与珊瑚状白内障密切相关的基因GJA8、GJA3、CRYGC、CRYGD进行筛查。从UCSC数据库获取候选基因序列, 以Primer Premier 6.0软件设计引物(表1), 引物由北京梓熙生物公司合成。

候选基因直接测序分析: 用DNA提取试剂盒QIAamp Blood kit(QIAGEN公司)提取家系成员DNA, -4℃保存。体外扩增目的片段: PCR反应体系为25μL, 其中DNA

表1 家系1 候选筛查基因外显子 PCR 引物序列

Gene(exon)	Forward primers (5'→3')	Reverse primers (5'→3')
CRYGC-1 2	CAATCATATAGACAGAGCCA	CTTTATGCCCAACCAGCTTCCC
CRYGC-3	GACAATTCCATGCCACAACCT	CTTGTTCAAACACTACTTACC
CRYGD-1	AGTGAGCTGCATAGGATGAGA	GTCTCGTCTCTCGTAGAAGGT
CRYGD-2	AGCCAGTGATAGCAATCCGAA	CCAAAATATGCAAGAGAGGAG
CRYGD-3	CTGAATCTCTGTGCTCGGTAA	AGGTCTCACTCTCTCAAAGAA
GJA3-1	CCTCGGCTCTCTCTCAGCTC	ACTAGAAGGAGGAAACGAGGA
GJA3-2-1	TCAGCCCCATCCCAGTACCATC	ACTTTTCAGGTTCTATCTGCTGG
GJA3-2-2	TCTACAACGGCCACCACCACCT	GTTCACTTTTCACTTCCCATTTC
GJA3-2-3	CCAAGACAGTGCTAATTTGCC	AATTCTACACTCTATCCACTC
GJA3-2-4	GGGTTGGAGATGAGCATGAGA	GTGTGATTTTGAATACCTGCT
GJA8-1	ACACAGCTCTCCATTTCTCTC	AAGTCTAGCCATCCCAGCCCA
GJA8-2	TTGTTCTTAGTCTTAGTCTG	ACTTTAGTGGGTCGATGGGTT

1 μ L, LA Taq 聚合酶 12.5 μ L, ddH₂O 9.5 μ L, 正、反向引物各 1 μ L。PCR 反应条件设为:98 $^{\circ}$ C 预变性 1min;98 $^{\circ}$ C 变性 10s;退火 60 $^{\circ}$ C 30s;延伸 72 $^{\circ}$ C 1min;循环 30 次,然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。4 $^{\circ}$ C 保存。检测 PCR 产物:PCR 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶在 120V 恒压下电泳 5~10min,由北京梓熙生物公司测序,测序结果与 UCSC 基因组序列进行比对分析,检查各基因序列有无碱基发生改变。

2 结果

2.1 家系成员遗传特点和临床表型 经详细的病史询问,5 例家系成员中 3 例患病,其中女 2 例,男 1 例,绘制系谱图呈常染色体显性遗传(图 1)。先证者晶状体混浊双眼受累,白内障表型特殊:晶体点片状混浊从后极部中央向前方呈放射状分布,中央部密集,周边分散,形似珊瑚(图 2)。未发现家系内患者眼部其他疾病及全身系统疾病。

2.2 候选基因突变分析 3 例家系成员候选基因直接测序分析后,发现所有患者的 CRYGD 的第 2 个外显子的第 70 位碱基 C 被 A 替换,该点突变导致第 24 位的脯氨酸(P)被苏氨酸(T)替代(图 3),而家系中的正常个体未发生此突变,突变位点与核苷酸多态性(SNP)数据库进行对比,排除了 SNP 的可能,家系中表型与基因型共分离。

3 讨论

大约 1/3 的先天性白内障发生与遗传缺陷有关,主要有三种遗传方式:常染色体显性遗传(autosomal dominant, AD)、常染色体隐性遗传(autosomal recessive, AR)和 X 连锁隐性遗传(X-linked recessive, XR),其中常染色体显性遗传最常见。先天性白内障的晶状体混浊部位及形态不一,本试验家系表型是较为罕见的珊瑚状白内障,晶状体点片状混浊从后极部中央向前方呈放射状分布,中央部密集,周边分散,形似珊瑚。2002 年 Santhiya 等^[2]首先将一印度板层状先天性白内障家系致病基因突变定位于 CRYGD(c. 70C>A),之后该错义突变在不同种族背景中陆续被报道,该点突变导致的先天性白内障表型还有珊瑚状^[3]、束状^[4]、核性^[5]、蓝色花冠状^[6]和皮刺状白内障^[7]。这些研究表明,CRYGD 基因的 c. 70C>A(p. Pro24Thr)突变导致的白内障表型具有明显的临床异质性,而即使同为珊瑚状表型也可因晶状体混浊形态和程度不同而存在一定差别。

目前,已经明确与常染色体显性遗传性白内障相关的基因主要有四类:(1)晶状体蛋白基因:CRYAA、CRYAB、

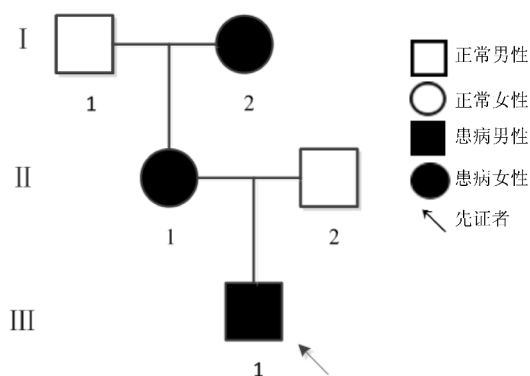


图1 遗传性白内障家系系谱图。

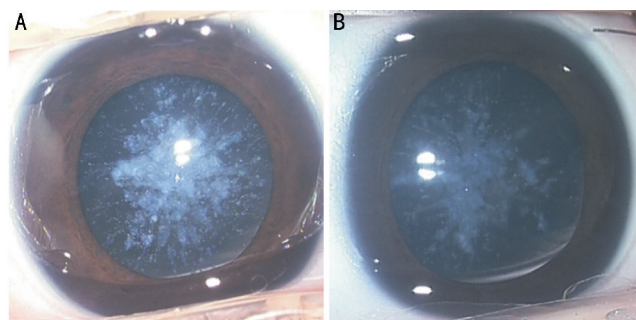


图2 先天障家系先证者图片 A:左眼;B:右眼。

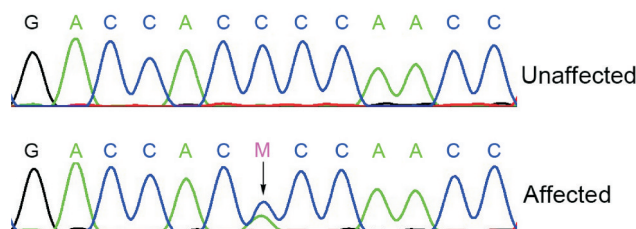


图3 ADCC 家系中非患者与患者 CRYGD 基因测序结果,箭头所示为突变位点 c. C70A。

CRYBA1/A3、CRYBA4、CRYBB1、CRYBB2、CRYGC、CRYGD、CRYGS;(2)膜蛋白基因:MIP、GJA3、GJA8;(3)调节眼球发育基因:PITX3、PAX6、MAF;(4)其它基因:BFSP2、HSF4、EPA2、FTL、CHMP4B。人晶状体内 90% 的可溶性蛋白为晶状体蛋白,由 α 、 β 、 γ 晶状体蛋白基因编码,其中 γ 晶状体蛋白占 25%。 γ -D 晶状体基因是胚胎期晶状体细胞高表达的基因,其编码的人类的 γ -D 晶状

体蛋白是一种高度稳定的可溶性蛋白, γ -D晶状体蛋白对于维持晶状体透明性和屈光性非常重要。晶状体蛋白的结构和功能发生改变有可能导致蛋白稳定性和水溶性下降,出现晶体混浊,临床上表现为白内障。目前报道CRYGD基因有17种点突变与先天性白内障相关^[2,8-23]。

本试验将该家系的致病位点定位于CRYGD基因的c. 70C>A。目前对于该突变导致遗传性先天性白内障的机制研究主要围绕突变蛋白结构及功能展开。 γ -D晶状体蛋白由两个结构域组成,每个结构域由包含4个反向 β 折叠的“Greek key”组成。 γ -D晶状体蛋白的第24位的脯氨酸位于第一个Greek key的N-末端结构域^[24],Evans等^[25]发现第24位氨基酸残基改变可使边缘的 β 链延伸,使 β 折叠含量增加,可能导致蛋白质沉淀。徐伟珍等^[26]发现P24T突变使非极性的脯氨酸被极性的苏氨酸取代,苏氨酸游离的羟基暴露于蛋白大分子表面,使分子间形成氢键的可能性增加,这一变化可能影响突变体 γ -D晶状体蛋白与其他蛋白质之间的相互作用。Jung等^[27]发现P24T突变体局部构象与野生型不同,推测24位脯氨酸被苏氨酸替代后启动聚合,使溶解度降低和形成了高分子量复合物。Shentu等^[4]认为CRYGD(P24T)突变使晶状体细胞内球状高密度沉积物增加,造成晶状体混浊。Yao等^[28]发现突变改变了氨基酸残基之间的氢键长短和弯曲度,使蛋白质功能受影响。

本研究发现,CRYGD基因第2个外显子中第70位碱基发生C→A的改变使24位脯氨酸变为苏氨酸(p. Pro24Thr),这是该珊瑚状白内障家系的分子学致病基础,也为先天性白内障患者展开基因诊断和基因治疗奠定基础。

参考文献

- Francis PJ, Berry V, Bhattacharya SS, et al. The genetics of childhood cataract. *Med Genet* 2000;37(7):481-488
- Santhiya ST, Manohar MS, Rawley D, et al. Novel mutation in the γ -crystallin genes cause autosomal dominant congenital cataracts. *Med Genet* 2002;39(5):352-358
- Yang G, Xiong C, Li S, et al. A recurrent mutation in CRYGD is associated with autosomal dominant congenital coralliform cataract in two unrelated Chinese families. *Mol Vis* 2011;17:1085-1089
- Shentu X, Yao K, Xu W, et al. Special fasciculiform cataract caused by a mutation in the gammaD-crystallin gene. *Mol Vis* 2004;10:233-239
- Burdon KP, Wirth MG, Mackey DA, et al. Investigation of crystallin genes in familial cataract, and report of two disease associated mutations. *Br J Ophthalmol* 2004;88(1):79-83
- Nandrot E, Slingsby C, Basak A. Gamma - D crystallin gene (CRYGD) mutation causes autosomal dominant congenital cerulean cataracts. *Med Genet* 2003;40(4):262-267
- Vanita V, Singh D. A missense mutation in CRYGD linked with autosomal dominant congenital cataract of aculeiform type. *Mol Cell Biochem* 2012;368(1-2):167-172
- Stephan DA, Gillanders E, Vanderveen D, et al. Progressive juvenile-onset punctate cataracts caused by mutation of the gamma D-crystallin gene. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96(3):1008-1012
- Zhang LY, Gong B, Tong JP, et al. A novel gamma D-crystallin mutation causes mild changes in protein properties but leads to congenital coralliform cataract. *Mol Vis* 2009;15(8):1521-1529
- Reis LM, Tyler RC, Muheisen S, et al. Whole exome sequencing in

- dominant cataract identifies a new causative factor, CRYBA2, and a variety of novel alleles in known genes. *Hum Genet* 2013;132(7):761-770
- Plotnikova OV, Kondrashov FA, Vlasov PK, et al. Conversion and compensatory evolution of the gamma-crystallin genes and identification of a cataractogenic mutation that reverses the sequence of the human CRYGD gene to an ancestral state. *Am J Hum Genet* 2007;81(1):32-43
- Kmoch S, Brynda J, Asfaw B, et al. Link between a novel human gamma D-crystallin allele and a unique cataract phenotype explained by protein crystallography. *Hum Mol Genet* 2000;9(22):1779-1786
- Sun W, Xiao SZ, Li SQ, et al. Mutation analysis of 12 genes in Chinese families with congenital cataracts. *Mol Vis* 2011;17:2197-2206
- Wang L, Chen X, Lu Y, et al. A novel mutation in gamma D-crystallin associated with autosomal dominant congenital cataract in a Chinese family. *Mol Vis* 2011;17:804-809
- Wang BB, Yu CH, Xi YB, et al. A novel CRYGD mutation (p. Trp43Arg) causing autosomal dominant congenital cataract in a Chinese family. *Hum Mutat* 2010;32(1):1939-1947
- Santana A, Waiswol M, Arcieri ES, et al. Mutation analysis of CRYAA, CRYGC, and CRYGD associated with autosomal dominant congenital cataract in Brazilian families. *Mol Vis* 2009;15:793-800
- Heon E, Priston M, Schorderet DF, et al. The gamma-crystallins and human cataracts; a puzzle made clearer. *Am J Hum Genet* 1999;65(5):1261-1267
- Li F, Wang S, Gao C, et al. Mutation G61C in the CRYGD gene causing autosomal dominant congenital coralliform cataracts. *Mol Vis* 2008;14:378-386
- Roshan M, Vijaya PH, Lavanya GR, et al. A novel human CRYGD mutation in a juvenile autosomal dominant cataract. *Mol Vis* 2010;16:887-896
- Messina-Baas OM, Gonzalez-Huerta LM, Cuevas-Covarrubias SA. Two affected siblings with nuclear cataract associated with a novel missense mutation in the CRYGD gene. *Mol Vis* 2006;12:995-1000
- Hanse L, Yao W, Eilberg H, et al. Genetic heterogeneity in microcornea- cataract: five novel mutations in CRYAA, CRYGD and GJA8. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(9):3937-3944
- Devi RR, Yao WL, Vijaylakshmi P, et al. Crystallin gene mutations in Indian families with inherited pediatric cataract. *Mol Vis* 2008;14:1157-1170
- Zhang LY, Yam GH, Fan DS, et al. A novel deletion variant of Γ d-crystallin responsible for congenital nuclear cataract. *Mol Vis* 2007;13:2096-2104
- Basak A, Bateman O, Slingsby C, et al. High-resolution X-ray crystal structures of human γ D crystallin (1.25 Å) and the R58H mutant (1.15 Å) associated with aculeiform cataract. *Mol Biol* 2003;28(5):1137-1147
- Evans P, Wyatt K, Wistow GJ, et al. The P23T cataract mutation causes loss of solubility of folded gammaD-crystallin. *Mol Biol* 2004;343(2):435-444
- 徐伟珍, 郑树, 董琦等. 遗传性珊瑚状白内障突变晶状体蛋白分子构型及超微结构分析. *浙江大学学报(医学版)* 2005;34(3):243-247
- Jung J, Byeon IJ, Wang Y, et al. The structure of the cataract-causing P23T mutant of human gammaD-crystallin exhibits distinctive local conformational and dynamic changes. *Biochemistry* 2009;48(12):2597-2609
- Yao K, Sun ZH, Shentu XC, et al. Computer construction and analysis of protein models of the mutant gamma D-crystallin gene. *Chin Med J* 2005;118(9):738-741