

·论著·

一个 CRYAA 基因突变先天性白内障家系

丰亚丽 邢立臣 胡莹 周欣荣 原慧萍

【摘要】目的 研究一个四代常染色体隐性遗传性先天性白内障家系的致病基因。**方法** 调查研究。采集一个先天性白内障家系中3例患者和1例表型正常者的外周静脉血各5 ml, 收集100例正常人外周静脉血各5 ml作为对照, 提取所有参与者基因组DNA。选择与先天性白内障发生相关的八个致病基因(CRYAA、CRYAB、CRYBA1、CRYGC、CRYGD、CRYGS、GJA3、GJA8)作为候选基因, 进行聚合酶链反应扩增候选基因的外显子及毗邻内含子。扩增产物进行直接测序, 测序结果与GeneBank中序列进行BLAST比对分析, 寻找突变位点。**结果** 该家系中先证者及患者均在CRYAA基因第1外显子发生c.160 C>T杂合突变, 导致其编码的晶状体蛋白第54位精氨酸变为半胱氨酸(p.R54C)。该家系中参与研究的1名表型正常者和100名正常对照者无此基因突变。**结论** CRYAA基因c.160 C>T(p.R54C)突变是导致该先天性白内障家系致病的主要原因。

【关键词】 先天性白内障; 系谱; CRYAA基因

A novel mutation c.160 C>T (p.R54C) in CRYAA in a Chinese family with congenital cataracts

Feng Yali, Xing Lichen, Hu Ying, Zhou Xinrong, Yuan Huiping. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China

Corresponding author: Yuan Huiping, Email: yuanhp2013@126.com

[Abstract] **Objective** To identify the genetic defect in a Chinese family with congenital cataracts. **Methods** It was a investigative study. The detailed family history and clinical data of the family were recorded. After informed consent was obtained, genomic DNA was extracted from the venous blood of the family members and 100 normal controls. Candidate gene sequencing was performed to screen out disease-causing mutations. Bioinformatics analysis was performed by polymorphism phenotyping (PolyPhen-2). The result indicated that the 54th amino acid position was highly conserved. **Results** In this study, a mutation (c.160 C>T transversion) was detected in the CRYAA gene. This mutation resulted in the substitution of highly conserved arginine by cysteine at codon 54 (p.R54C). The causative mutation was found in the patients only; the rest of the family members were without incident and were unaffected. **Conclusion** In this study, we identified a novel mutation c.160 C>T (p.R54C) in CRYAA in a Chinese family with congenital cataract.

【Key words】 Congenital cataract; Pedigree; CRYAA

先天性白内障是儿童常见的致盲性眼病, 亚洲有超过100万盲童患有白内障^[1], 其中约8.3%~25%与遗传相关^[2]。研究表明, 先天性白内障遵从3种类型的孟德尔遗传方式, 包括常染色体显性遗传, 常染色体隐性遗传和X性连锁遗传3种, 其中常染色体显性遗传最为常见^[3]。在遗传性白内障致病基因的

研究中, 迄今为止, 约一半的致病突变发生在晶状体蛋白基因(CRYAA、CRYAB、CRYBA1、CRYBA4、CRYBB1、CRYBB2、CRYBB3、CRYGC、CRYGD、CRYGS), 其中有1/4致病突变发生在缝隙链接蛋白(GJA3、GJA8), 还有致病突变发生在细胞骨架蛋白(BFSPl、BFSP2)、转录因子(MAF、PAX6)等。在本研究中, 收集一个常染色体隐性遗传性先天性白内障家系, 通过基因测序发现了该家系的致病基因及其突变位点。

1 对象与方法

1.1 对象

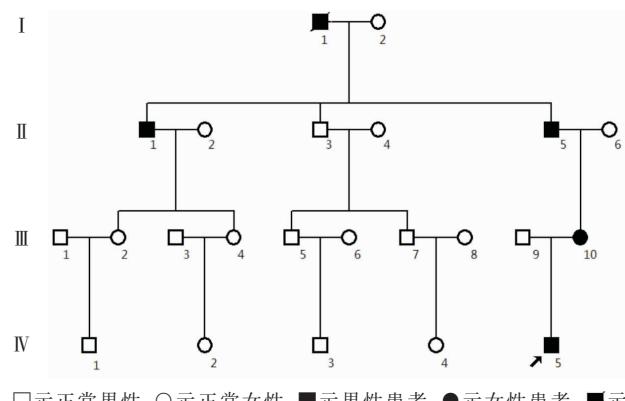
DOI:10.3760/cma.j.issn.1674-845X.2014.11.013

基金项目: 黑龙江省自然科学基金重点项目(ZD201015); 黑龙江省青年资金(QC08C97)

作者单位: 150086 哈尔滨医科大学附属第二医院眼科(丰亚丽、邢立臣现在齐齐哈尔医学院附属第三医院眼科)

通信作者: 原慧萍, Email:yuanhp2013@126.com

调查研究。中国东北黑龙江的一个4代常染色体隐性遗传的先天性白内障家系,追溯调查家系成员共23例,其中5例为患者,男3例,女2例;参与本研究的家系成员共4例,其中患者3例(II5、III10、IV5),表型正常者1例(II3)(见图1)。随机招募100例无白内障的正常人作为对照。本研究遵循赫尔辛基宣言,对家系成员及对照者进行全面的体检检查,排除眼部之外的疾病。参与者被告知研究目的并签署知情同意书。



□示正常男性,○示正常女性,■示男性患者,●示女性患者,■示已逝男性患者,▲示先证者

图1 常染色体隐性遗传先天性白内障家系系谱

表1 PCR反应引物序列

外显子	正向引物(5'-3')	逆向引物(5'-3')	长度(bp)
CRYAA-1	CCATTCTGCTGGTGGCAT	AGCAAGACCAGACTCCATC	392
CRYAA-2	ACATGGCACGTTGGATTC	CTCACTGCCTGGGCTCAC	163
CRYAA-3	GCAGCTTCTCTGGCATGG	ATGGAGACAGCACCGAG	837
CRYAB-1	CAGCTGAAGGAGCTGACCA	AAGGACTCTCCGTCTAGC	300
CRYAB-2	CCATCCCATTCCCTTACCTT	TGCACTGAATGAATGAGCA	198
CRYAB-3	TCTCTCTGCCCTTTCTCTCA	GAGCCCTCTAAATCATAATG	472
CRYBA1-1	AGGGAGAGCAGAGTGCTGAC	TCTTCTCCAGCCACCTAGA	232
CRYBA1-2	TCGTGTGCTCTGTCTTCC	TGGGGTTTTCTGGTCAGTC	194
CRYBA1-3	CTAGCTCTTGCCTCATTC	TCTTCCCCTATCCCCACTCT	235
CRYBA1-4	GGCTTGAAACACCATGAACA	TCATATGCACGGAAGTGGAA	218
CRYBA1-5	CATGAAGAATGATAGCCATA	TTCCAACCTGTTTTGTACT	228
CRYBA1-6	AGGCTCAGGTTTGGGTAT	GGAATTATCGTACTTGGAGC	250
CRYGC-1,2	CCTGCTATATAGACTGGCTGT	CCTCCCTGTAACCCACATTG	700
CRYGC-3	CCTTCTTCTGTGGACCGAGT	TGAAAAGAATGACAGAACGTC	530
CRYGD-1	AGAACACGAAAATGCCCTTG	GTCTCACAGGCCTGCTCCT	337
CRYGD-2	CTGTGAGACCTCGCCTTGTG	GGGTCTGACTTGAGGATGT	354
CRYGD-3	CTGTGAGACCTCGCCTTGTG	GGGTCTGACTTaGAGGATG	423
GJA3-1	ATGCCCTGCTCTGTGGAGAAG	AGACGTAGGTCCGCAGCAG	600
GJA3-2	GGAGGAGCACCTGAAGAGAG	GGTCAGGGCTAGCACTTGA	699
GJA3-3	GCTGGAAGAAGCTCAAGCA	TGCACTTGGTTTGTTTC	597
GJA8-1	CCGCGTTAGCAAAACAGAT	CAGCGGAACCTTCTTAGTGC	518
GJA8-2	ATGGAGGAGAAGCGCAAAG	GTCTCCACCATCCCAACCT	563
GJA8-3	TCCCTTCATCTGCCCTACG	ATGCCCTGCTCTGTGGAGAAG	599
CRYGS-1	TCACTGTGCCCTCTAACTCT	GCGGGTAGGCTAAAATCA	129
CRYGS-2	TCTTCTCTGTTGGCCCTCT	GGGACTACACAGTCCCCAG	295
CRYGS-3	TTTCTGTTCATTTCTCCTGTG	AAAGGAACCACCACATGTC	580

1.2 实验方法

1.2.1 提取DNA 对该家系中的3例患者(II5、III10、IV5)均抽取外周静脉血5 ml。并用试剂盒(TIANamp Genomic DNA Kit)提取基因组DNA,紫外分光光度计定量。

1.2.2 候选基因的引物设计与合成 根据文献报道选择CRYAA、CRYAB、CRYBA1、CRYGC、CRYGD、CRYGS、GJA3和GJA8作为候选基因,设计该8个基因的引物,由中国上海英俊生物技术有限公司合成(见表1)。

1.2.3 PCR 以DNA为模板,根据设计的引物进行PCR扩增。PCR体系25 μl:dNTP混合物2 μl,2×GC Buffer 12.5 μl,正反向引物(10×10⁻⁶ mol/L)各0.5 μl,DNA模板(30 mg/L)1 μl,LA Taq聚合酶0.5 μl,去离子水8 μl。PCR反应条件:95 °C 5 min;35个循环:94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 45 s;72 °C 10 min。将PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳15 min,紫外灯下成像检测。将PCR产物及引物送北京天一辉远生物科技有限公司进行提纯后双向测序。将测序结果与Genebank中的原始序列进行Blast比对,同时应用Chromas(version 2.22)对所得到的序列

峰图进行分析,以确定基因突变位点。

1.2.4 生物信息软件分析 应用在线软件 PolyPhen-2 分析 CRYAA 蛋白突变前后结构和功能的改变。应用 K-D hydropathy plot 程序分析蛋白的疏水性改变。

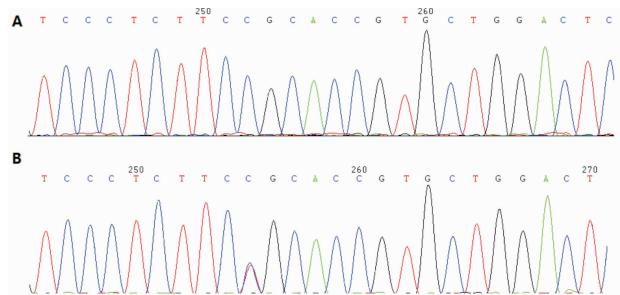
2 结果

2.1 临床表型分析

该家系中参与本研究的3例患者均表现为双眼先天性白内障,无其他眼部疾患。发病特点为自幼双眼发病,幼时对视力影响不大,成年后病情发展较迅速,需接受白内障手术治疗,白内障特点为珊瑚状混浊。先证者(IV5),足月产,双眼出生后1个月出现晶状体混浊,3岁半行双眼白内障手术并植入IOL,术后双眼矫正视力分别为0.2和0.5。

2.2 基因测序

候选基因测序结果显示 CRYAA 基因第1个外显子中第160位胞嘧啶替换为胸腺嘧啶(c.160 C>T),导致其编码的氨基酸由精氨酸变为半胱氨酸(p.R54C)(见图2)。该家系成员的3例患者均存在该突变位点,在100例对照组中没有发现该突变位点。

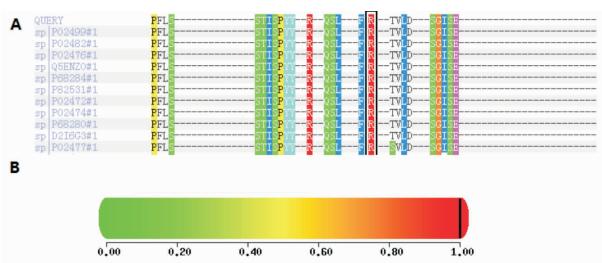


A,家系中正常人 CRYAA 基因测序结果未发现突变;B,家系中患者 CRYAA 基因测序结果显示 cDNA 序列第 160 位碱基胞嘧啶被胸腺嘧啶取代(c.160 C>T),导致编码的蛋白产物第 54 位氨基酸精氨酸被半胱氨酸取代(P.R54C)

图2 常染色体显性遗传先天性白内障患者 CRYAA 基因第一个外显子测序结果

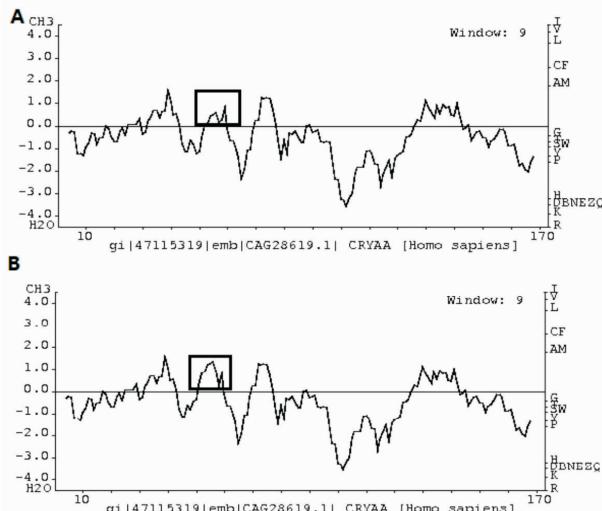
2.3 生物信息学分析

氨基酸保守性分析:应用 PolyPhen-2 在线分析突变位置氨基酸保守性,结果显示在不同物种间 CRYAA 蛋白第 54 位的精氨酸在进化上是保守的(见图3A)。PolyPhen 得分为 1.000(风险程度范围为 0~1,分值越大,破坏性程度越高)。这表明 c.160 C>T 突变对蛋白质的功能产生了破坏性的影响(见图3B)。K-D hydropathy plot 程序分析结果显示精氨酸替代位置周围的疏水性增加(见图4)。



A,在不同物种间第 54 位氨基酸高度保守;B,评分结果为 1.00,预测该突变可能是破坏性的

图3 Polyphen 软件分析不同物种间 CRYAA 氨基酸序列保守性



A,野生型 CRYAA 蛋白疏水性分析;B,与野生型相比突变型 CRYAA 疏水性明显增强(黑方框示)

图4 K-D hydropathy plot 软件预测 CRYAA 蛋白 R54C 疏水性改变

3 讨论

遗传性先天性白内障具有显著的遗传异质性,不同表型的白内障可由相同的基因突变导致,不同的基因突变可导致相同表型的白内障。

遗传性先天性白内障临床表型各异有核性、绕核性、点状、缝隙状、板层、前极性、后极性、粉尘状、珊瑚状、花冠状、盘状白内障等。目前发现,至少有17个基因与先天性白内障的发生有关,包括晶状体蛋白基因、膜蛋白基因、细胞骨架蛋白基因、发育调节基因、与代谢有关的蛋白基因等。

人晶状体内 90% 可溶性蛋白为晶状体蛋白,分别是 α 晶体蛋白(40%)、 β 晶体蛋白(35%)、 γ 晶体蛋白(25%),由 3 类晶状体蛋白基因 α 、 β 、 γ 编码^[4]。CRYAA 蛋白是脊椎动物晶状体的主要蛋白质,在保持晶状体透明度和适当的折射率中起结构性的作用。CRYAA 蛋白是小热休克蛋白家族成员,也是压力诱导蛋白,具有分子伴侣活性^[5-6]。

CRYAA 包含一个保守的 α -晶体结构域(约 90

个氨基酸),由疏水性的 NH₂-末端结构域(约 60 个氨基酸)和亲水性的非结构化的羧基末端(约 30 个氨基酸)构成^[7-8]。遗传和生物化学方面的研究表明,一些基因突变引起的晶状体混浊与 α 晶体蛋白的分子伴侣活性下降相关。到目前为止,已经报道了一些 CRYAA 的突变位点,其中在第 54 位精氨酸的突变是一个突变热点。2007 年,Khan 等^[9]报道了一个常染色体隐性遗传的先天性白内障合并小角膜家系的 CRYAA(R54C)错义突变。此外,Gong^[10]的研究表明 CRYAA 的 R54C 突变导致了人类和小鼠的隐性白内障。2008 年 Devi 等^[11]实验结果显示,CRYAA 的 R54C 突变也与常染色体显性遗传先天性核性白内障伴小角膜相关,同时一个 CRYAA 的错义突变(R54P)被确定在一个常染色体显性遗传 Y-缝白内障家族中。CRYAA 蛋白的第 54 位氨基酸位于 NH₂ 末端区域,这是 α-晶体蛋白聚集的重要决定因素,同时在 CRYAA 蛋白抵抗环境压力中扮演重要角色^[12]。本研究中,应用蛋白疏水性软件分析显示在 CRYAA 蛋白 R54C 突变点周围局部疏水性增加。此外,应用 polyphen 在线预测结果显示 R54C 可能具有破坏性的。对其他晶状体蛋白研究结果表明,晶状体蛋白活性与其疏水性相关,增加疏水作用可能会降低溶解度或导致折叠异常^[13-15]。

对于 CRYAA,蛋白疏水性的改变也影响蛋白质的结构和功能。Sharma 等^[15]研究结果显示 CRYAA 具有蛋白疏水性的 NH₂-末端结构域参与分子伴侣的活性。Shroff 等^[16]指出,CRYAA 蛋白的 116 位氨基酸突变(R116C)使 α 晶体蛋白高度寡聚,从而改变蛋白结构引起分子伴侣功能减弱。因此,我们推测,CRYAA 蛋白 R54C 突变使晶体蛋白的疏水性增加,可能影响它的低聚和分子伴侣的活性。此外,敲除小鼠模型已经证明,在 CRYAA 的 R49C 突变可提高蛋白质的不溶性和细胞死亡^[17]。该天然蛋白是活性多肽,其抗凋亡特性是保持晶状体上皮细胞生存的重要因素。由于第 54 位氨基酸与第 49 氨基酸相邻,因此,R54C 可能有与 R49C 相似的作用。因此,本研究中的 R54C 突变可能降低了晶状体蛋白对周围压力的抵抗并提高了细胞死亡。推测所有这些改变最终导致了该家系白内障的形成。

参考文献:

- [1] Francis PJ, Berry V, Bhattacharya SS, et al. The genetics of childhood cataract[J]. J Med Genet, 2000, 37: 481-488.
- [2] 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[J]. Mol Vis, 2006, 12: 995-1000.
- [3] Francis PJ, Moore AT. Genetics of childhood cataract[J]. J Med Genet, 2004, 37: 481-488.
- [4] Stambolian D, Ai Y, Sidjanin D, et al. Cloning of the galactokinase cDNA and identification of mutation in two families with cataracts[J]. Nat Genet, 1995, 10: 307-312.
- [5] Graw J. Genetics of crystallins: cataract and beyond[J]. Exp Eye Res, 2009, 88: 173-189.
- [6] Andley UP. Effects of alpha-crystallin on lens cell function and cataract pathology[J]. Curr Mol Med, 2009, 9: 887-892.
- [7] Asomugha CO, Gupta R, Srivastava OP. Structural and functional properties of NH(2)-terminal domain, core domain, and COOH-terminal extension of alphaA and alphaB-crystallins [J]. Mol Vis, 2011, 17: 2356-2367.
- [8] Augusteyn RC. Alpha-crystallin: a review of its structure and function[J]. Clin Exp Optom, 2004, 87: 356-366.
- [9] Khan AO, Aldahmesh MA, Meyer B. Recessive congenital total cataract with microcornea and heterozygote carrier signs caused by a novel missense CRYAA mutation (R54C)[J]. Am J Ophthalmol, 2007, 144: 949-952.
- [10] Gong X. An identical alphaA-crystallin mutation (R54C) leads to recessive cataracts in humans and mice[J]. Am J Ophthalmol, 2008, 145: 587.
- [11] Devi RR, Yao W, Vijayalakshmi P, et al. Crystallin gene mutations in Indian families with inherited pediatric cataract[J]. Mol Vis, 2008, 14: 1157-1170.
- [12] Yang C, Salerno JC, Koretz JF. NH2-terminal stabilization of small heat shock protein structure: a comparison of two NH2-terminal deletion mutants of alphaA-crystallin[J]. Mol Vis, 2005, 11: 641-647.
- [13] Flaug SL, Kosinski-Collins MS, King J. Contributions of hydrophobic domain interface interactions to the folding and stability of human gammaD-crystallin[J]. Protein Sci, 2005, 14: 569-581.
- [14] Flaug SL, Kosinski-Collins MS, King J. Interdomain sidechain interactions in human gammaD-crystallin influencing folding and stability[J]. Protein Sci, 2005, 14: 2030-2043.
- [15] Sharma KK, Kumar RS, Kumar GS, et al. Synthesis and characterization of a peptide identified as a functional element in alphaA-crystallin[J]. J Biol Chem, 2000, 275: 3767-3771.
- [16] Shroff NP, Cherian-Shaw M, Bera S, et al. Mutation of R116C results in highly oligomerized alpha A-crystallin with modified structure and defective chaperone-like function[J]. Biochemistry, 2000, 39: 1420-1426.
- [17] Xi JH, Bai F, Gross J, et al. Mechanism of small heat shock protein function in vivo: a knock-in mouse model demonstrates that the R49C mutation in alpha A-crystallin enhances protein insolubility and cell death[J]. J Biol Chem, 2008, 283: 5801-5814.

(收稿日期:2014-04-07)

(本文编辑:季魏红,毛文明)