

Usher 综合征一家系的致病基因分析

杜伟,徐敏,解正高

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(No. 81500759)
作者单位:(225001)中国江苏省扬州市,扬州大学附属苏北人民医院眼科
作者简介:杜伟,毕业于北京大学医学部,眼科学博士,主治医师,研究方向:遗传学眼病、眼底病。
通讯作者:解正高,毕业于上海交通大学,医学博士,主任医师,副教授,科主任,研究方向:眼底病、眼外伤。zhenggaoxie@163.com
收稿日期:2018-01-22 **修回日期:**2018-08-24

Genetic analysis of a family with Usher syndrome

Wei Du, Min Xu, Zheng-Gao Xie

Foundation item: National Science Foundation of China (Youth Foundation No. 81500759)

Department of Ophthalmology, Subei People's Hospital Affiliated to Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Zheng-Gao Xie. Department of Ophthalmology, Subei People's Hospital Affiliated to Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China. zhenggaoxie@163.com

Received:2018-01-22 Accepted:2018-08-24

Abstract

• **AIM:** To analyze the clinical features of a Usher syndrome family and explore the pathogenic gene of the disease.

• **METHODS:** A Chinese family with Usher syndrome was involved in our study. After informed consent, careful clinical examinations were taken and 4mL blood were obtained. The whole genome DNA was extracted and target - captured next generation sequencing of the proband was performed to identify suspected mutations. We used Sanger sequencing to verify the detected mutations in all the members of the family, as well as in 100 normal controls.

• **RESULTS:** In addition to typical retinitis pigmentosa, the patients suffered from mild to moderate sensorineural deafness. Sequencing results revealed compound heterozygous mutations (c.2310_2311insA and c.8559-2A>G) of *USH2A* gene in the patients, and either of the mutations was found in normal relatives that had consanguinity with the patients. Both of the mutations were not found in other members of the family and normal individuals.

• **CONCLUSION:** *USH2A* is the pathogenic gene of the disease in this family. The mutation c.8559-2A>G (IVS42) is a previously reported mutation, while the mutation c.2310_2311 insA (p. E771Rfs * 8) is a novel mutation. The study has expanded the mutation spectrum of *USH2A* gene resulting in Usher syndrome.

• **KEYWORDS:** Usher syndrome; *USH2A* gene; frameshift mutation; splice site mutation

Citation: Du W, Xu M, Xie ZG. Genetic analysis of a family with Usher syndrome. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018;18(10):1880-1882

摘要

目的:对一 Usher 综合征家系的临床特征进行分析,探索该家系的致病基因。

方法:收集于我院就诊的一视网膜色素变性家系,详细询问患者病史并进行临床检查,诊断为 Usher 综合征,抽取家系成员静脉血 4mL,提取全基因组 DNA,对先证者进行靶向捕获高通量测序获得突变位点,对于筛选出的可疑突变扩展至家系全体成员进行 Sanger 测序验证,同时在 100 名正常对照者中验证。

结果:患者除视网膜色素变性表现外,还存在轻至中度感音神经性耳聋,测序结果发现家系患者 *USH2A* 基因复合杂合突变 c.2310_2311insA (p. E771Rfs * 8) 和 c.8559-2A>G (IVS42),而在与患者有直系血缘关系的亲属中发现仅存在其中 1 个突变,其他家属成员和正常人中未发现该两种突变。

结论:*USH2A* 基因为该家系的致病基因,c.8559-2A>G (IVS42) 突变为已报道的热点突变,而 c.2310_2311insA (p. E771Rfs * 8) 突变则为首次报道,本研究扩展了 *USH2A* 基因导致 Usher 综合征的突变谱。

关键词:Usher 综合征;*USH2A* 基因;移码突变;剪切位点突变

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.10.30

引用:杜伟,徐敏,解正高. Usher 综合征一家系的致病基因分析. 国际眼科杂志 2018;18(10):1880-1882

0 引言

Usher 综合征是一组主要以视网膜色素变性和不同程度听觉障碍为主要特征的疾病综合征,又称为遗传性视网膜色素变性-感音神经性耳聋综合征,发病率约为 1/23 000^[1]。根据疾病临床特征,Usher 综合征可分为三型^[2]: I 型最严重,表现为先天性重度听力下降、前庭功能障碍,伴有早发视网膜色素变性; II 型最为常见,听力损失程度相对较轻,表现为中重度感音神经性耳聋,视网膜色素变性发病时间相对较晚; III 型视网膜色素变性发病时间不定,前庭功能不定,听力障碍程度与 II 型类似,但病情呈渐进性加重。该疾病有较高的遗传异质性,主要遗传方式为常染色体隐性遗传,目前已发现 12 个与 Usher 综合征相关的致病基因^[3-14],与 II 型 Usher 综合征相关的基因有 3 个,分别为 *USH2A*^[9]、*GPR98*^[10] 和 *WHRN*^[11] 基因。其中

USH2A 基因突变致病最为常见。本研究采用靶向捕获高通量测序的方法发现了家系 *USH2A* 基因的复合杂合突变 c. 2310_2311insA (p. E771Rfs * 8)、c. 8559-2A>G (IVS42), 其中突变 c. 2310_2311insA (p. E771Rfs * 8) 在既往的文献中未见报道, 现将结果报告如下。

1 对象和方法

1.1 对象 收集 2017-06 于我院就诊的一视网膜色素变性家系(图 1), 共 11 例, 其中有 2 例患者, 详细询问患者病史并进行临床检查, 诊断为 Usher 综合征。

1.2 方法 本研究遵循赫尔辛基宣言, 经苏北人民医院伦理委员会批准, 在获得患者和/或家属知情同意后采集每名家系成员静脉血 4mL (EDTA 抗凝血) 进行致病基因突变分析: (1) 基因组 DNA 提取: 使用血液基因组 DNA 提取试剂盒, 操作按照试剂盒说明书进行。(2) 靶向捕获二代测序: 将与 Usher 综合征相关致病基因 (*MYO7A*、*USH1C*、*CDH23*、*PCDH15*、*USH1G*、*CIB2*、*USH2A*、*GPR98*、*WHRN*、*CLRN1*、*CEP250*、*ARSG* 共 12 个基因^[3-14]) 的基因组外显子区域定制罗氏 NimbleGen 捕获探针, 进行目标基因全外显子捕获测序: 1) 首先使用 Cavoris 仪打断基因组 DNA 使其片段化至 200bp 左右, 然后经过末端补平修复、3'-端磷酸化、添加接头、扩增、杂交、洗涤磁珠和洗脱 DNA、洗脱产物扩增等标准步骤制备文库; 2) Illumina hiseq2500 平台标准化上机测序, 使用 Basecall 分析软件得到原始数据; 3) 数据分析: 去除接头污染和低质量的数据, 将数据与参考序列比对统计, 进行单核苷酸多态性 (SNP) 和插入缺失标记 (Indel) 检测及注释。根据测序深度, 突变质量, 对检测得到的 SNP、Indel 进行过滤筛选, 分析氨基酸变化影响、剪切影响、UTR、内含子突变影响等, 得到高质量可靠的突变。使用 SIFT 软件利用基于同源比对、蛋白结构保守性等算法, 预测筛选出变异对蛋白结构和功能的影响, 对剪切位点附近的突变, 做剪切危害性预测。(3) 一代测序 (Sanger 法) 验证: 将二代测序得到的高度可疑突变位点扩展至家系全体成员及 100 名正常对照进行验证, 对突变位点周围序列设计引物, 采用聚合酶链式反应 (PCR) 进行扩增, PCR 扩增产物用 ABI 3730XL 测序仪测序, 基因序列分析采用 DNASTAR 软件进行序列分析和比对。

2 结果

家系 2 例患者为姐弟关系, 姐姐 II-2 年龄 49 岁, 临床表现为双侧轻度感音神经性耳聋, 无前庭功能障碍, 双眼视网膜色素变性、双眼并发性白内障 (图 2), 其中左眼已行白内障手术, 最佳矫正视力分别为右眼 0.05、左眼 0.3; 弟弟 II-3 年龄 42 岁, 临床表现为中度感音神经性耳聋, 无前庭功能障碍, 双眼视网膜色素变性、双眼并发性白内障 (图 3), 其中右眼已行白内障手术, 最佳矫正视力分别为右眼 FC/50cm、左眼 HM/50cm。

对先证者 II-3 进行靶向捕获测序, 结果分析提示 *USH2A* 基因两个可疑突变 c. 2310_2311insA (p. E771Rfs * 8) 和 c. 8559-2A>G (IVS42), Sanger 测序结果验证显示另一例患者 II-2 同时携带此两个突变 (测序峰图见图 4), 而与患者有直系血缘关系的亲属 I-1、I-2、II-6、III-1、III-2 仅携带其中一个突变、均未发病, 其他家系成员和 100 名正常对照中未发现该两种突变。考虑这两个突变为 *USH2A* 基因的复合杂合突变。

3 讨论

Usher 综合征具有高度遗传异质性, 最常见的遗传方

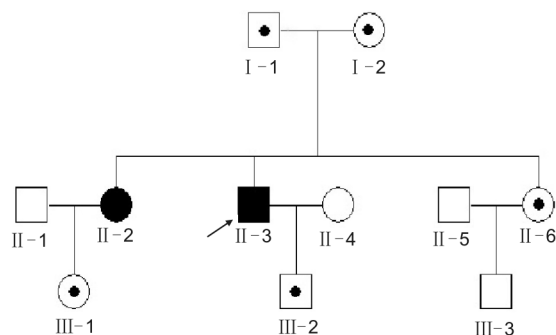


图 1 Usher 综合征家系图 注: □和○分别代表正常男性和女性; ■和●分别表示男性和女性患者; ◻和◉分别表示男性和女性携带者; 黑色斜箭头所指为先证者。

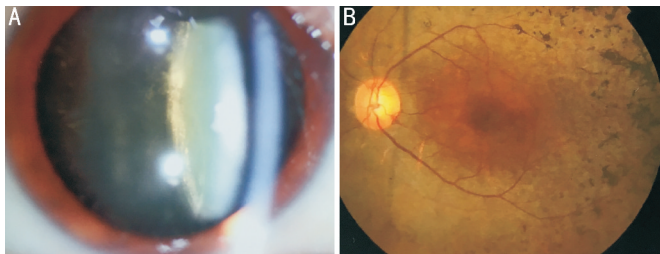


图 2 家系成员 II-2 A: 右眼前节照相可见晶状体明显后囊下混浊; B: 左眼眼底清晰可见视盘颜色尚可, 视网膜萎缩、血管明显变细, 中周边部视网膜可见骨细胞样色素沉着。

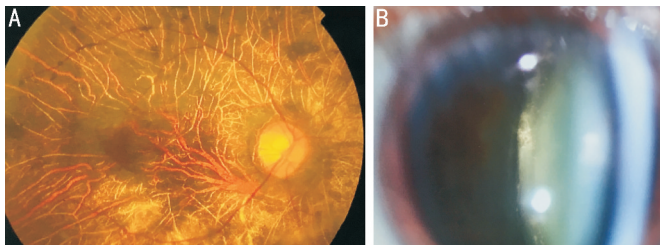


图 3 家系成员 II-3 A: 右眼眼底可见视盘颜色变淡, 视网膜萎缩严重, 中周边部视网膜可见骨细胞样色素沉着; B: 左眼前节照相可见晶状体明显后囊下混浊。

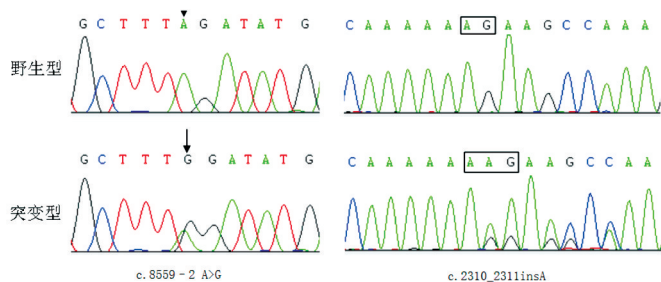


图 4 家系 Sanger 测序峰图。

式为常染色体隐性遗传^[15], 目前已知的疾病相关基因就有 12 个, *USH2A* 是最常见的致病基因, 目前已发现位于该基因各个外显子上的上百种突变, 包含有错义突变、无义突变、剪切位点突变、插入缺失等各种类型, 单 *USH2A* 基因就拥有 72 个外显子, 编码 5202 个氨基酸, 因此采用一代测序的方法进行该疾病致病基因的突变筛查无疑将耗费很大的时间和精力。随着二代测序技术的发展, 其成本越来越低, 使得将靶向捕获高通量测序技术应用到常规的致病基因筛查中成为可能^[16-17]。通过二代测序技术可以更快捷有效地发现致病突变, 从而进行基因诊断和遗传咨询。

我们通过靶向捕获高通量测序技术对一个中国 Usher 综合征家系进行了致病基因的分析,发现了导致该家系发病的复合杂合突变,一个为剪切位点变异,另一个为移码突变。内含子和外显子交接区域的剪切位点突变 c.8559-2A>G 会导致 *USH2A* 基因转录时第 43 号外显子被跳过,这将导致组成第 15 个 FN3 重复结构的 41 个氨基酸被删除,该突变是一个热点突变,已在既往研究中被报道过^[18]。而本研究中另一个既往文献中未报道过的致病突变 c.2310_2311insA (p. E771Rfs * 8) 是一个移码突变,该突变会导致肽链的合成提前终止,产生截短的转录本,通过无义介导的 mRNA 衰变的细胞保护性机制而降解。

本研究证实了靶向捕获高通量测序可以快速有效地进行 Usher 综合征的致病基因分析、发现致病突变,但该技术的不足之处在于不能覆盖 CNV 的检测,而 CNV 的变异已经证实是该疾病的重要发病原因之一^[19]。因此在部分患者致病基因筛查时联合 CNV 的变异分析也是必要的选择。

目前对于 Usher 综合征尚无有效的治疗办法,由于腺病毒介导的基因替代治疗在部分早期视网膜色素变性患者中取得了良好的效果,有不少的研究者将该疾病治疗的研究方向聚焦于基因替代治疗上,但 Usher 综合征最常见的两个致病基因 *MOY7A* 和 *USH2A* 基因片段均过大而 AAV 病毒难以承载^[20]。因此在治疗尚未取得突破性进展的情况下,基因筛查产前诊断和遗传咨询显得更为重要。

综上所述,*USH2A* 基因的复合杂合突变为该家系的发病原因,c.8559-2A>G (IVS42) 突变为已报道的热点突变,而 c.2310_2311insA (p. E771Rfs * 8) 突变则为首次报道,本研究进一步拓展了 Usher 综合征的突变谱。

参考文献

- 1 Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. *Lancet* 2006;368(9549):1795-1809
- 2 Smith RJ, Berlin CI, Hejtmancik JF, et al. Clinical diagnosis of the Usher syndromes. Usher Syndrome Consortium. *Am J Med Genet* 1994;50(1):32-38
- 3 Ramzan K, Al-Owain M, Huma R, et al. Utility of whole exome sequencing in the diagnosis of Usher syndrome: Report of novel compound heterozygous MYO7A mutations. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2018;108:17-21
- 4 Sun T, Xu K, Ren Y, et al. Comprehensive Molecular Screening in Chinese Usher Syndrome Patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018;59(3):1229-1237
- 5 Schultz JM, Bhatti R, Madeo AC, et al. Allelic hierarchy of CDH23 mutations causing non-syndromic deafness DFNB12 or Usher syndrome USH1D in compound heterozygotes. *J Med Genet* 2011;48(11):767-775

- 6 Abdi S, Bahloul A, Behlouli A, et al. Diversity of the Genes Implicated in Algerian Patients Affected by Usher Syndrome. *PLoS One* 2016;11(9):e0161893
- 7 Rizel L, Safieh C, Shalev SA, et al. Novel mutations of MYO7A and USH1G in Israeli Arab families with Usher syndrome type 1. *Mol Vis* 2011;17:3548-3555
- 8 Riazuddin S, Belyantseva IA, Giese AP, et al. Alterations of the CIB2 calcium- and integrin-binding protein cause Usher syndrome type 1J and nonsyndromic deafness DFNB48. *Nat Genet* 2012;44(11):1265-1271
- 9 García-García G, Aller E, Jaijo T, et al. Novel deletions involving the USH2A gene in patients with Usher syndrome and retinitis pigmentosa. *Mol Vis* 2014;20:1398-1410
- 10 Kahrizi K, Bazazzadegan N, Jamali L, et al. A novel mutation of the USH2C (GPR98) gene in an Iranian family with Usher syndrome type II. *J Genet* 2014;93(3):837-841
- 11 Ebermann I, Scholl HP, Charbel Issa P, et al. A novel gene for Usher syndrome type 2: mutations in the long isoform of whirlin are associated with retinitis pigmentosa and sensorineural hearing loss. *Hum Genet* 2007;121(2):203-211
- 12 García-García G, Aparisi MJ, Rodrigo R, et al. Two novel disease-causing mutations in the CLRN1 gene in patients with Usher syndrome type 3. *Mol Vis* 2012;18:3070-3078
- 13 Khateb S, Zelinger L, Mizrahi-Meissonnier L, et al. A homozygous nonsense CEP250 mutation combined with a heterozygous nonsense C2orf71 mutation is associated with atypical Usher syndrome. *J Med Genet* 2014;51(7):460-469
- 14 Khateb S, Kowalewski B, Bedoni N, et al. A homozygous founder missense variant in arylsulfatase G abolishes its enzymatic activity causing atypical Usher syndrome in humans. *Genet Med* 2018 [Epub ahead of print]
- 15 Khalaileh A, Abu-Diab A, Ben-Yosef T, et al. The Genetics of Usher Syndrome in the Israeli and Palestinian Populations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018;59(2):1095-1104
- 16 Aparisi MJ, Aller E, Fuster-García C, et al. Targeted next generation sequencing for molecular diagnosis of Usher syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2014;9:168
- 17 Besnard T, García-García G, Baux D, et al. Experience of targeted Usher exome sequencing as a clinical test. *Mol Genet Genomic Med* 2014;2(1):30-43
- 18 Dai H, Zhang X, Zhao X, et al. Identification of five novel mutations in the long isoform of the USH2A gene in Chinese families with Usher syndrome type II. *Mol Vis* 2008;14:2067-2075
- 19 Eisenberger T, Neuhaus C, Khan AO, et al. Increasing the yield in targeted next-generation sequencing by implicating CNV analysis, non-coding exons and the overall variant load: the example of retinal dystrophies. *PLoS One* 2013;8(11):e78496
- 20 Mathur P, Yang J. Usher syndrome: Hearing loss, retinal degeneration and associated abnormalities. *Biochim Biophys Acta* 2015;1852(3):406-420