



Usher综合征2型一家系USH2A基因新突变

程萌 杨鸽 雷博 刘宇莹 金学民

450052 郑州大学第一附属医院眼科 (程萌、杨鸽、刘宇莹、金学民); 450003 河南省人民医院
郑州大学人民医院 河南省立眼科医院 河南省眼科研究所 (雷博)

通信作者: 金学民, Email: 2740913223@qq.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2018.03.014

【摘要】目的 定位1个Usher综合征2型(USH2)家系的致病基因突变。方法 1个USH2家系3代7名成员纳入研究。其中,患者2例、健康成员5名。2例患者均为男性。所有受试者均行最佳矫正视力、裂隙灯显微镜、间接检眼镜、全视野视网膜电图、光相干断层扫描、视野检查。采集所有受试者外周静脉血3 ml,提取基因组DNA。选择136个遗传性视网膜疾病致病基因作为目标基因;将提取的DNA采用高通量测序并与数据库对比,确定候选致病基因突变位点。聚合酶链反应和直接测序法在家系成员及100名正常对照者中进行验证,确定致病性突变位点。结果 DNA测序发现,2例患者均携带USH2A基因第27号外显子c.5459T>C(p.M1820T)、第7号外显子c.1190T>A(p.I397K)、第5号外显子c.802G>A(p.G268R)3个杂合性错义突变,其中c.5459T>C和c.1190T>A为新发现突变。患者表型正常的父亲、母亲分别为c.1190T>A(p.I397K)错义突变携带者和c.5459T>C(p.M1820T)和c.802G>A(p.G268R)复合杂合突变携带者。根据基因检测结果表明该家系的遗传方式为常染色体隐性遗传。其余表型正常的家系成员和正常对照者均未同时检测到这3个突变位点。突变在该家系中呈现共分离状态。结论 USH2A基因杂合性错义突变c.5459T>C(p.M1820T)、c.1190T>A(p.I397K)、c.802G>A(p.G268R)是该家系的致病基因。

【关键词】 Usher综合征/遗传学; Usher综合征/病因学; 基因; 突变; 序列分析

基金项目: 国家自然科学基金(81271033、81470621)

中图分类号: R774

Novel mutations in the USH2A gene in a family affected with Usher syndrome type 2 Cheng Meng, Yang Ge, Lei Bo, Liu Yuying, Jin Xuemin

Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Cheng Meng, Yang Ge, Lei Bo, Liu Yuying, Jin Xuemin); Henan Eye Institute & Henan Eye Hospital, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, China (Lei Bo, Jin Xuemin)

Corresponding author: Jin Xuemin, Email: 2740913223@qq.com

【Abstract】 Objective To identify the pathogenic genes and mutations in a family with Usher syndrome type 2. **Methods** A three-generation family including 7 individuals was enrolled in this study. There were 2 male patients and 5 unaffected individuals. All participants were underwent related ophthalmologic examination, including best corrected visual acuity, slit-lamp, indirect ophthalmoscopy, electroretinogram (ERG), optical coherence tomography and visual field test. DNA was extracted from 3 ml peripheral venous blood of all participants. A total of 136 hereditary retinal disease target genes were screened and the DNA sequence was performed by Next-generation sequence analysis. Then the suspected mutations compared with databases to identify the suspected mutations, which should be verified with non-affected family members and 100 normal subjects by PCR and Sanger sequence. **Results** The sequence result showed that 2 patients, the proband and his brother, carried complex heterozygous mutations in the USH2A gene: c.5459T>C (p.M1820T) in exon 27, c.802G>A (p.G268R) in exon 5 and c.1190T>A (p.I397K) in exon 7. The c.5459T>C and c.1190T>A mutations in USH2A have not been reported in the literature and database. Although their mother carried c.5459T>C (p.M1820T) and c.802G>A (p.G268R), and their father carried c.1190T>A (p.I397K) heterozygous mutations, the parents did not present phenotype. These mutations were not detected in other normal family members. The result was supported by co-segregation analysis. **Conclusions** The heterozygous mutations c.5459T>C (p.M1820T), c.1190T>A (p.I397K) and c.802G>A (p.G268R) in USH2A gene cause Usher syndrome in this family.

【Key words】 Usher syndromes/genetics; Usher syndromes/etiology; Genes; Mutation; Sequence analysis

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81271033,81470621)

Usher综合征 (USH) 是一种以耳聋和视网膜色素变性 (RP) 为特征的常染色体隐性遗传疾病^[1]。临床上根据听力和前庭功能受累情况将其分为1 (USH1)、2 (USH2)、3 (USH3) 等3种临床亚型^[2]。其中,USH2最为常见^[3],表现为先天性中度-重度非渐进性耳聋,前庭功能正常,20岁左右出现RP症状^[4,5]。USH具有高度遗传异质性,研究发现,超过70%的USH2是USH2A基因突变所致^[6]。我们对一个USH2家系进行了相关致病基因检测,旨在明确该家系患者的致病基因。现将结果报道如下。

1 对象和方法

本研究获郑州大学第一附属医院伦理委员会批准;严格遵守赫尔辛基宣言,所有受试者及未成年受试者监护人均签署知情同意书。一个三代USH2家系 (图1) 中2例患者及5名正常家系成员纳入研究。所有受试者均行最佳矫正视力 (BCVA)、裂隙灯显微镜、间接检眼镜、全视野视网膜电图 (ERG)、光相干断层扫描 (OCT)、视野检查,以及前庭功能和纯音测听检查。同时招募100名无血缘关系的健康志愿者作为正常对照者进行USH基因测序比对。

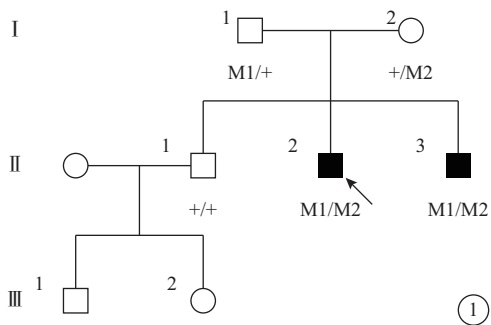


图1 患者家系图。■: 男性患者; □: 正常男性; ○: 正常女性; ↑: 先证者; M1: p.I397K/c.1190T>A; M2: p.M182T/c.5459T>C; M3: G268R/c.802G>A

先证者 (II 2), 男, 32岁。10岁时双耳出现听力下降; 目前双耳重度感音神经性耳聋, 前庭功能未见异常。12岁时双眼出现夜盲。双眼BCVA分别为0.4、0.7。视盘颜色淡, 视网膜血管变细, 周边弥漫性骨细胞色素颗粒沉着 (图2)。全视野ERG明适应、暗适应a、b波重度下降。OCT检查可见黄斑中心凹以外区域视网膜明显变薄, 尤以视细胞层明显 (图3)。视野向心性缩小 (图4)。先证者弟弟 (II 3), 30岁。双耳

重度感音神经性耳聋, 前庭功能正常。双眼BCVA分别为0.9、0.8。眼底表现及全视野ERG、OCT、视野检查结果同先证者 (II 2)。家系成员BCVA、眼底、视野、OCT、全视野ERG检查均未见异常。依据临床检查结果并结合家系分析, 患者符合常染色体隐性遗传USH2诊断标准^[7]。

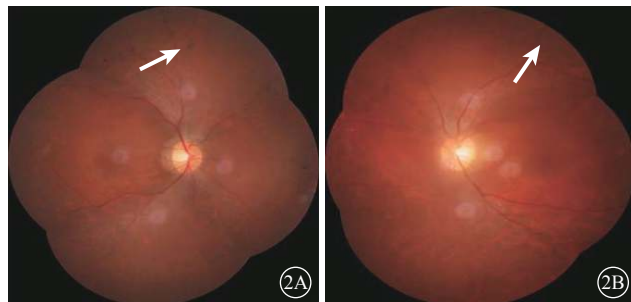


图2 先证者 (II 2) 双眼彩色眼底像。2A. 右眼; 2B. 左眼。视盘颜色淡, 视网膜血管变细; 周边部视网膜骨细胞色素沉着 (白箭)

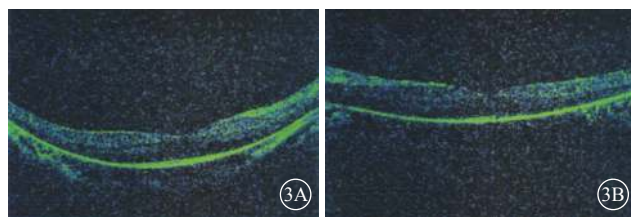


图3 先证者 (II 2) 双眼OCT像。3A. 右眼; 3B. 左眼。黄斑中心凹以外区域视网膜明显变薄, 尤其以视细胞层更为明显

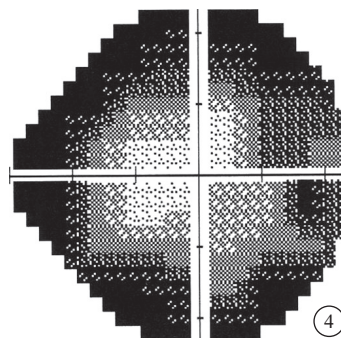


图4 先证者 (II 2) 视野检查像。视野向心性缩小

采集家系中7名受试者的外周静脉血3 ml, 乙二胺四乙酸抗凝。采用天根生化科技 (北京) 有限公司血液基因组DNA提取试剂盒按照标准操作流程提取全基因组DNA, 紫外分光光度计定量。应用北京迈基诺公司提供的遗传眼病目标基因试剂盒对目前已知的136个遗

传性视网膜疾病致病基因的外显子区域进行捕获。每例患者提取3 μg DNA作为起始量，采用超声仪进行超声片段化，打断样本片段为150碱基对，对其进行末端补平、两端加A、连接adaptor、纯化，文库质量检测后进行杂交、洗脱、连接介导聚合酶链反应（PCR）扩增对捕获文库富集。

PCR产物采用Beckman Ampure beads按1.8:1体积进行纯化，应用II-lumina HiSeq 2500进行高通量测序。测序结果通过基因组数据库、共识编码序列计划、NCBI数据库单核苷酸多态性（SNP）子库、单核苷酸多态性数据库、千人基因组计划、人基因组数据库对SNP进行注释，确定候选致病基因突变位点。

所有检测出的可能致病突变均通过Sanger测序进行验证并进行家系共分离验证。Sanger测序结果再通过SIFT预测去掉不影响蛋白功能的SNPs，最终确定致病性基因突变位点。

2 结果

USH基因测序结果显示，2例患者（II₂、II₃）的USH2A基因第27、7、5号外显子分别存在c.5459T>C（p.M1820T）、c.1190T>A（p.I397K）、c.802G>A（p.G268R）3个杂合性错义突变（图5）。其中，27号外显子第5459位核糖核苷酸T变C，导致其编码的第1820位氨基酸由甲硫氨酸变为苏氨酸；7号外显子第1190位核糖核苷酸T变A，导致其编码的第397位氨基酸由异亮氨酸变为赖氨酸；5号外显子第802位核糖核苷酸G变A，导致其编码的第268位氨基酸由甘氨酸变为精氨酸。3个杂合性错义突变中，c.5459T>C和点突变c.1190T>A为新发现突变位点。

先证者（II₂）父亲（I₁）携带有c.1190T>A（p.I397K）突变，母亲（I₂）携带有c.5459T>C（p.M1820T）和c.802G>A（p.G268R）2个突变位点。其余表型正常的家系成员和正常对照者均未同时检测到这3个突变位点（图6）。突变在该家系中呈现共分离状态。

先证者（II₂）、先证者父亲（I₁）、哥哥（II₁）、女儿（III₂）均携带另一个与USH有关的GPR98基因的杂合错义突变c.4703G>A（p.S1568N）。先证者（II₂）、先证者母亲（I₂）、哥哥（II₁）、儿子（III₁）均携带GPR98基因的杂合错义突变c.15701A>G（p.K5234R）。突变在该家系中未出现共分离。

3 讨论

迄今为止，已确定与USH相关的致病基因14个，

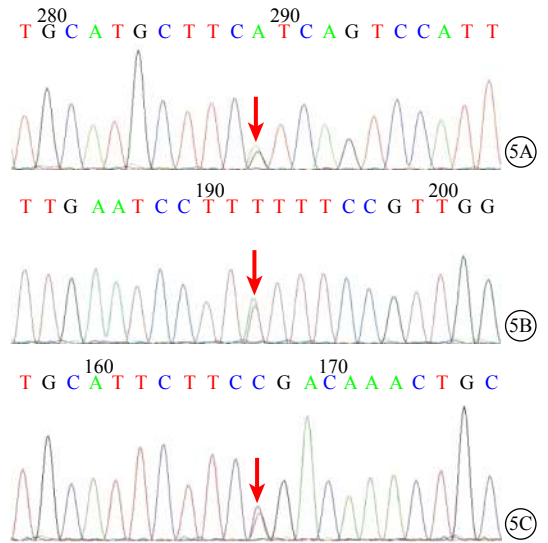


图5 USH2患者USH基因测序图。5A. USH2A基因第27号外显子的c.5459T>C（p.M1820T）错义突变（红箭）；5B. USH2A基因第7号外显子的c.1190T>A（p.I397K）错义突变（红箭）；5C. USH2A基因第5号外显子的c.802G>A（p.G268R）错义突变（红箭）

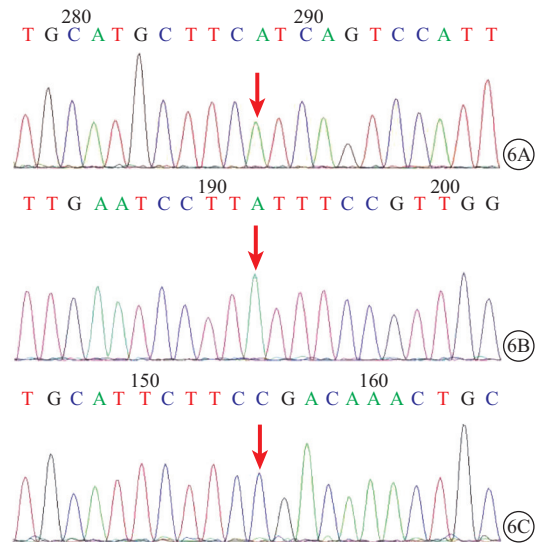


图6 正常对照者USH基因测序图。6A~6C. 分别为USH2A基因第27、7、5号外显子外显子5459、1190、802位点，均不存在突变

其中MYO7A、USH1C、CDH23、PCDH15、SANS、CIB2等6个致病基因与USH1相关；USH2A、VLGR1、WHRN等3个致病基因与USH2相关^[5, 8, 9]；CLRN1与USH3相关^[10]。此外HARS和ABHD12也被确定与非典型USH3相关^[11, 12]。2个修饰基因PDZD7和CEP250也被发现^[13, 14]。USH2A是USH2最常见的致病基因^[3]。因此，USH2A基因的测序筛查是诊断USH2的首选。

USH临床特征和基因遗传的高度异质性使得该疾病难以通过一代测序对其进行分子水平的诊断。因

此,本研究采用目标区域捕获联合高通量测序技术对USH患者的致病基因突变进行检测。结果发现USH2A基因的3个错义突变c.5459T>C、c.1190T>A、c.802G>A,其中c.5459T>C、c.1190T>A为新发现的突变位点。已有文献报道,错义突变c.802G>A为USH2的相关致病突变^[5]。本家系中携带c.802G>A和c.5459T>C2突变的受试者(I₂)表型正常,且无其他证据可以证明错义突变c.802G>A为导致本家系发病的原因。因此,与既往报道错义突变c.802G>A可能为致病突变不同^[5],仅有c.802G>A点突变可能不足以导致USH2。疾病表型发生的具体机制尚不明确。因此,进行深入的分子生物学研究,了解USH2A基因突变对Usherin蛋白的结构和与其他蛋白间相互作用所造成的影响,以及阐明USH2A基因突变造成听力损伤的病理生理机制十分必要。本家系中发现的3个杂合性错义突变c.5459T>C、c.1190T>A、c.802G>A与疾病表型共分离,且在正常人数据库对比中均未发现此3个突变同时出现。因此,我们考虑3个位点同时发生变异是导致本家系USH2的遗传学基础。先证者父亲(I₁)携带c.1190T>A(p.I397K)突变,母亲(I₂)携带c.5459T>C(p.M1820T)和c.802G>A(p.G268R)2个突变位点,根据基因检测结果表明本家系的遗传方式为常染色体隐性遗传。

在GPR98基因上检测到2个杂合性错义突变c.4703G>A(p.S1568N)和c.15701A>G(p.K5234R),其中错义突变c.4703G>A已有文献报道与耳聋的发生相关^[15]。但是本家系中仅携带该突变位点的家系成员(III₂)并未发生耳聋,所以我们认为该突变位点的致病性有待进一步确认。携带GPR98基因复合杂合突变(c.4703G>A和c.15701A>G)的家系成员(II₁)临床表型正常,故考虑该复合杂合突变不是本家系的致病突变。先证者(II₂)同时携带GPR98的复合杂合突变和USH2A基因的3个杂合性错义突变,患者(II₃)仅携带USH2A基因的3个杂合性错义突变,而2例患者的临床表型和临床分型均一致,故推测GPR98基因的2个突变位点可能为非致病性突变,且可能对于USH2A基因的复合杂合突变的致病性无协同作用。

因此,本研究在USH2A基因上检测到的3个杂合性错义突变位点,c.5459T>C(p.M1820T)、c.1190T>A(p.I397K)和c.802G>A(p.G268R),构成复合杂合性突变为本家系的致病原因。该家系成员在USH2A基因3个位点同时出现变异时才表现出临床症状。

4 参考文献

- [1] Boughman JA, Vernon M, Shaver KA. Usher syndrome: definition and estimate of prevalence from two high-risk populations[J]. *J Chronic Dis*, 1983, 36(8): 595-603.
- [2] Millán JM, Aller E, Jaijo T, et al. An update on the genetics of usher syndrome [J/OL]. *J Ophthalmol*, 2011, 2011:417217[2011-12-23]. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/417217>. DOI: 10.1155/2011/417217.
- [3] Vache C, Besnard T, le Berre P, et al. Usher syndrome type 2 caused by activation of an USH2A pseudoexon: implications for diagnosis and therapy[J]. *Hum Mutat*, 2012, 33(1): 104-108. DOI: [10.1002/humu.21634](https://doi.org/10.1002/humu.21634).
- [4] Keats BJ, Corey DP. The usher syndromes[J]. *Am J Med Genet*, 1999, 89(3): 158-166.
- [5] Dreyer B, Brox V, Tranebjaerg L, et al. Spectrum of USH2A mutations in Scandinavian patients with Usher syndrome type II [J]. *Hum Mutat*, 2008, 29(3): 451. DOI: [10.1002/humu.9524](https://doi.org/10.1002/humu.9524).
- [6] Weston MD, Eudy JD, Fujita S, et al. Genomic structure and identification of novel mutations in usherin, the gene responsible for Usher syndrome type II a[J]. *Am J Hum Genet*, 2000, 66(4): 1199-1210.
- [7] Lentz J, Keats B. Usher syndrome type II [DB/OL]//Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al. GeneReviews®. Seattle (WA): University of Washington, 1999(2016-07-21)[2018-05-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1341/>.
- [8] Weston MD, Luijendijk MW, Humphrey KD, et al. Mutations in the VLRG1 gene implicate G-protein signaling in the pathogenesis of Usher syndrome type II [J]. *Am J Hum Genet*, 2004, 74(2): 357-366.
- [9] 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[J]. *Hum Genet*, 2007, 121(2): 203-211. DOI: [10.1007/s00439-006-0304-0](https://doi.org/10.1007/s00439-006-0304-0).
- [10] Sankila EM, Pakarinen L, Kaariainen H, et al. Assignment of an Usher syndrome type III (USH3) gene to chromosome 3q[J]. *Hum Mol Genet*, 1995, 4(1): 93-98.
- [11] Eisenberger T, Slim R, Mansour A, et al. Targeted next-generation sequencing identifies a homozygous nonsense mutation in ABHD12, the gene underlying PHARC, in a family clinically diagnosed with Usher syndrome type 3[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2012, 7: 59. DOI: [10.1186/1750-1172-7-59](https://doi.org/10.1186/1750-1172-7-59).
- [12] Puffenberger EG, Jinks RN, Sougnéz C, et al. Genetic mapping and exome sequencing identify variants associated with five novel diseases [J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(1): 28936 [2012-01-17]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028936>. DOI: 10.1371/journal.pone.0028936.
- [13] Ebermann I, Phillips JB, Liebau MC, et al. PDZD7 is a modifier of retinal disease and a contributor to digenic Usher syndrome[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(6): 1812-1823. DOI: [10.1172/JCI39715](https://doi.org/10.1172/JCI39715).
- [14] 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]. *J Med Genet*, 2014, 51(7): 460-469. DOI: [10.1136/jmedgenet-2014-102287](https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102287).
- [15] Miyagawa M, Naito T, Nishio SY, et al. Targeted exon sequencing successfully discovers rare causative genes and clarifies the molecular epidemiology of Japanese deafness patients [J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(8): 71381[2013-08-13]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071381>. DOI: 10.1371/journal.pone.0071381.