

CLN6 基因复合杂合突变导致神经元蜡样脂褐质沉积症一家系遗传学研究

楼 铁^{1,2}, 黄颖之¹, 董旻岳¹

1. 浙江大学医学院附属妇产科医院生殖遗传科 生殖遗传教育部重点实验室, 浙江 杭州 310006
2. 杭州市江干区人民医院妇产科, 浙江 杭州 310021

[摘要] **目的:**探讨一个常染色体隐性遗传神经元蜡样脂褐质沉积症(NCL)家系的遗传学原因。**方法:**应用目标区捕获高通量靶向测序对先证者进行候选基因突变筛查,并通过PCR测序在先证者及其父母中对突变位点进行验证;RT-PCR及TA克隆测序考察上述两种突变是否影响剪接。**结果:**测序结果显示先证者存在CLN6:c.486+2T>C和c.486+4A>T复合杂合突变,分别来自父母双方。RT-PCR及TA克隆测序提示两种突变均可导致两种异常剪接。**结论:**CLN6:c.486+2T>C和c.486+4A>T复合杂合突变很可能为该NCL家系患者的遗传学病因,新突变基因丰富了CLN6基因突变谱。



[关键词] 神经元蜡样脂褐质沉积病/遗传学;病因学;基因;突变;剪接体;聚合酶链反应

[中图分类号] R394.3 **[文献标志码]** A

Genetic study of a family of neuronal ceroid lipofuscinosis caused by a heterozygous mutation of CLN6 gene

LOU Tie^{1,2}, HUANG Yingzhi¹, DONG Minyue¹ (1. Key Laboratory of Reproductive Genetics, Ministry of Education, Department of Reproductive Genetics, Women's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310006, China; 2. Department of Gynecology and Obstetrics, Jianggan District People's Hospital, Hangzhou 310021, China)

Corresponding author: DONG Minyue, E-mail: dongmy@zju.edu.cn, <https://orcid.org/0000-0002-4344-7924>

[Abstract] **Objective:** To analyze the genetic cause of a family with autosomal recessive neuronal ceroid lipofuscinoses (NCL). **Methods:** The proband was screened for mutations within the coding region of the candidate genes through high-throughput

收稿日期:2019-03-28 接受日期:2019-04-15

基金项目:浙江省重点研发计划(2019C03025)

第一作者:楼 铁(1978—),女,硕士,主治医师,主要从事妇产科学研究;E-mail: tiel-2004@163.com; <https://orcid.org/0000-0002-1069-3803>

通信作者:董旻岳(1964—),男,博士,主任医师,博士生导师,主要从事生殖遗传学研究;E-mail: dongmy@zju.edu.cn; <https://orcid.org/0000-0002-4344-7924>

targeted sequencing. Potential causative mutations were verified by PCR and Sanger sequencing in the proband and his parents. RT-PCR and TA clone sequencing were performed to investigate whether the mRNAs were abnormally spliced. **Results:** The sequencing results revealed compound heterozygous mutations of *CLN6*: c.486 + 2T > C and c.486 + 4A > T, which were respectively inherited from his parents. RT-PCR and TA cloning sequencing suggested that the mRNAs were abnormally spliced in two forms due to both mutations. **Conclusions:** The compound heterozygous mutations of *CLN6*: c.486 + 2T > C and c.486 + 4A > T are possibly the genetic causes of the NCL family. Detection of the novel mutation has extended mutation spectrum of *CLN6*.

[**Key words**] Neuronal ceroid-lipofuscinoses/genetics; Etiology; Genes; Mutation; Spliceosomes; Polymerase chain reaction

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2019,48(4):373-377.]

神经元蜡样脂褐质沉积症(neuronal ceroid lipofuscinoses, NCL)是一组遗传性神经变性疾病^[1]。NCL患者在世界不同地区都有报道,患病率为1/100 000 ~ 1/14 000^[2],主要发生在欧洲、美国和一些亚洲国家(印度、巴基斯坦和日本等),中国较少报道。目前认为 *PPT1*、*TTP1*、*CLN3*、*DNAJC5*、*CLN5*、*CLN6*、*MFSD8*、*CLN8*、*CTSD* 等基因突变与NCL的发病相关^[3]。根据临床发病年龄和基因型,NCL可分为先天型、婴儿型、晚期婴儿型、青少年型和成年型^[4]。NCL的主要表现包括多种类型的癫痫发作、智力运动发育落后或倒退、视力损害、头颅影像显示大脑皮质和小脑萎缩^[5]。本研究对一个NCL核心家系进行了基因突变分析,明确其遗传学病因。

1 对象与方法

1.1 对象

该家系于2018年5月就诊于浙江大学医学院附属妇产科医院生殖遗传科。先证者,男性,10岁,5岁8个月时因“行走不稳1个月”于当地医院就诊,MRI检查提示小脑发育不良。半年后检查提示小脑萎缩。患者系足月剖宫产分娩,手术顺利,出生后2月余抬头,14个月开始学说话和走路,16个月能独立平稳走路,4岁开始读幼儿园,与同龄小孩身体智力发育水平无异常。近2~3年病情呈进行性加重,基本无法行走,智力、视力均明显减退,否认癫痫样发作病史,否认家族史。本研究方案经浙江大学医学院附属妇产科医院伦理委员会审查批准(20190041),研究对象均知情同意。

1.2 仪器及试剂

QIAamp DNA Blood Mini Kit (250) 为德国 QIAGEN 公司产品; PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 为日本 TaKaRa 公司产品; PCR 试剂 2 × Goldstar Best MasterMix (Dye) (货号 CW0656) 为康为世纪生物科技有限公司产品。NanoDrop 2000 分光光度计为美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品; PCR 扩增仪为美国 Bio-Rad 公司产品。引物合成和逆转录由生工生物工程(上海)股份有限公司完成(ABI 3730XL)。PCR 产物直接 Sanger 测序由北京六合华大基因科技有限公司完成。

1.3 DNA、RNA 提取及 cDNA 合成

采集先证者及其父母外周血6 mL(EDTA 抗凝)。取200 μL 外周血,提取基因组 DNA,分光光度计测定浓度,4 ℃保存。取250 μL 外周血,分别加入750 μL 提取基因组 DNA, -80 ℃保存; 再将上述 RNA 逆转录为 cDNA, -20 ℃保存。

1.4 高通量测序检测基因突变

由北京中科北泰医学科技有限公司完成高通量测序,检测项目为 NCL 遗传代谢相关基因。

1.5 PCR 测序验证基因突变

针对目标区域捕获高通量测序检出的先证者突变位点设计上下游引物(*CLN6*-4F、*CLN6*-4R, 表1)。反应体系:2 × 扩增缓冲液 15 μL, 上下游引物(20 μmol/L)各 0.6 μL, DNA 模板约 60 ng, 以双蒸水补足至 30 μL。反应条件:95 ℃变性 10 min; 95 ℃变性 30 s, 60 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 30 s, 35 个循环; 72 ℃再延伸 10 min。

1.6 RT-PCR 及 TA 克隆测序检测剪接体异常

为考察检出的突变是否影响剪接,以先证者及其父母外周血 cDNA 为模板,对潜在剪接异常区域进行扩增。为尽可能减少基因组 DNA 干扰,增加特异性,首先分别在 3 号与 6 号外显子上设计正反引物 (CLN6-mrE3-F、CLN6-mrE6-R,表 1),并进一步设计跨外显子引物 (CLN6-mrE3_E4-F、CLN6-mrE5_E6-R,表 1) 进行巢式 PCR 扩增。第一轮 PCR 体系:2 × 扩增缓冲液 5 μL,上下游引物 (20 μmol/L) 各 0.2 μL,cDNA 模板约 0.4 μL。第二轮 PCR 体系:2 × 扩增缓冲液 15 μL,上下游引物 (20 μmol/L) 各 0.6 μL,模板为极少量第一轮产物。反应条件:95 °C 变性 10 min;95 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 40 s,35 个循环;72 °C 再延伸 10 min。最终产物分别构建 TA 克隆,并挑取单克隆,以载体通用引物进行测序。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	引物序列(5'-3')	片段长度 (bp)*
CLN6-4F	GTGACATTCCAGCTGGAAGCGT	467
CLN6-4R	GAACACTTGAGCATCTAGCTTG	
CLN6-mrE3-F	CTTCCACATGGCCTACAACGTC	300
CLN6-mrE6-R	GCAGTAAAGCAGCCGCTGAAGT	
CLN6-mrE3_E4-F	TTCTCTTGCTCAAGCTCATCGAG	300
CLN6-mrE5_E6-R	GGATGTACCACATGCAGTGACC	

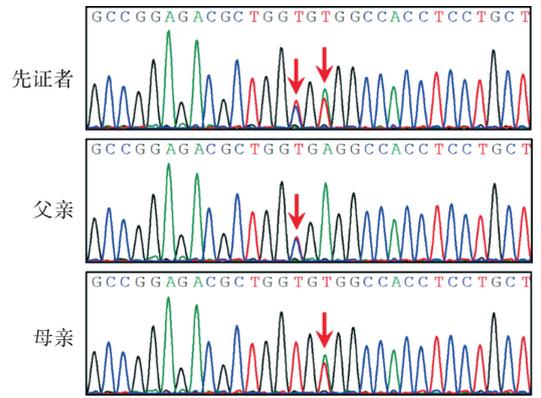
* 此为标准参考序列长度,实际 cDNA 片段大小可随剪接异常而变化。

2 结果

2.1 基因突变检测结果

先证者存在 *CLN6*:c.486+2T>C 和 c.486+

4A>T 杂合突变,父母分别为上述两种突变的杂合携带者(图 1)。先证者突变分别来自父母双方,从而确定先证者为复合杂合突变。



先证者检出 *CLN6*:c.486+2T>C 和 c.486+4A>T 复合杂合突变;父亲检出 *CLN6*:c.486+2T>C 杂合突变;母亲检出 *CLN6*:c.486+4A>T 杂合突变。箭头所示为突变位点。

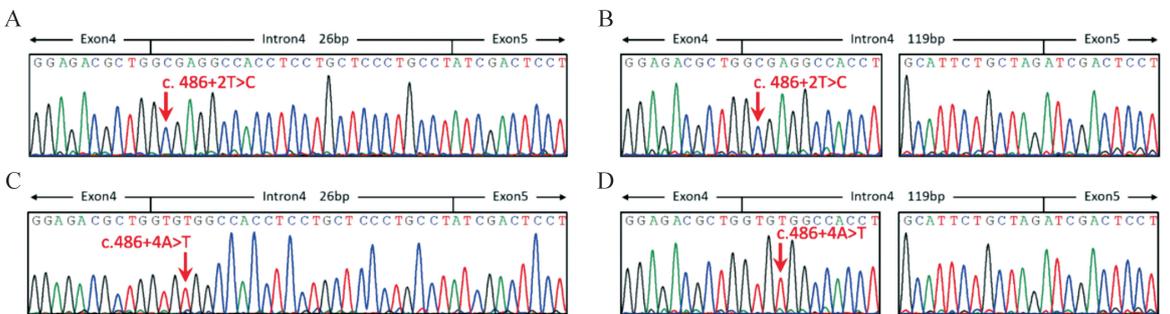
图 1 先证者及其父母 *CLN6* 基因的 Sanger 测序结果
Figure 1 Sanger sequencing of the *CLN6* gene in proband and parents

2.2 剪接体检测结果

先证者共挑取 13 个单克隆,测序显示全部为异常剪接体,且两种突变均可导致 4 号外显子延长 119 或 26 个碱基,造成移码并分别在第 10 位与第 19 位提前出现终止密码子 (premature termination codon) (图 2)。父母分别挑取 14 个与 16 个单克隆,经测序未发现异常剪接体。

3 讨论

NCL 是一种罕见的常染色体隐性遗传性神经退行性疾病。本研究检出的 *CLN6* 属于晚期婴儿型的突变型。*CLN6* 位于染色体 15q23,编码一



A、B 所示为 c.486+2T>C 突变导致 4 号外显子延长 26、119 bp;C、D 所示为 c.486+4A>T 突变导致 4 号外显子延长 26、119 bp。

图 2 先证者 cDNA TA 克隆测序结果

Figure 2 cDNA TA clone sequencing of the proband

种具有 7 个跨膜结构域的内质网膜蛋白,在溶酶体功能中发挥稳定作用^[6]。*CLN6* 突变导致 NCL 最初在哥斯达黎加发现,患者的临床症状呈非特异性,通常早期出现癫痫发作和运动障碍,其次是语言障碍、共济失调、智力退化和视力丧失,大脑 T2 加权 MRI 图像显示脑室周围白质的高信号伴有部分小脑萎缩^[7]。随着疾病进展,在大多数情况下,患儿 3~8 岁时出现视力丧失,并迅速发展为失明,往往在 10 岁时失去所有运动技能^[8]。目前没有针对 NCL 的病因学或疾病特异性治疗方法,仅对症治疗。由于该疾病无特异性的临床表现,通常 NCL 不是对此类病例的最初诊断,需要通过基因组测序来针对不明原因的癫痫发作或白质脑病或遗传性代谢紊乱来明确病因^[9]。本家系先证者 5 岁发病,最早出现的症状是共济失调,10 岁左右已出现明显运动障碍,智力与视力减退,癫痫发作情况并不典型,表型基本符合。

目前人类基因突变数据库 (HGMD 2018.4 版本) 收录 *CLN6* 基因共有 85 种不同的突变,其中错义突变 60 种,无义突变 6 种,小缺失突变 12 种,大缺失突变 2 种,重复突变 5 种,插入突变 2 种,其中 81 种突变已明确可以导致疾病发生,4 种突变还无法完全明确是否与疾病发生相关。本家系先证者检出的 *CLN6*:c.486+2T>C 和 c.486+4A>T 突变在 gnomAD 数据库中未记录,说明其在人群中极罕见 (PM2); 在 HGMD 数据库中,*CLN6*:c.486+2T>C 与 c.486+4A>T 均未报道。根据美国医学遗传学与基因组学学会 (ACMG) 指南 (2015),我们将这两种突变评级为可能致病 (PS*1,PM*1)。

众所周知,人类的基因为断裂基因,即由若干个外显子和内含子序列互相间隔开,但又连续镶嵌而成,去除内含子序列再连接后,可翻译出由连续氨基酸组成的完整蛋白质^[10]。内含子序列在经典剪接位点具有高度保守性,99.24% 的剪接位点符合 GT-AG 规则,因此一般认为在此位置发生的突变会影响基因的剪接^[11]。但实际上,有些非经典剪接位点突变也可影响剪接,因此在临床实践中,通常对与外显子侧翼 10 位之内的突变均应考虑其影响剪接的可能性。剪接突变可引起外显子跳跃、外显子延伸或截短,往往会导致移码,使所得的转录产物提早出现终止密码子^[12]。本家系中,*CLN6* 第 4 外显子在 2 和 4 位上发生剪接突

变,造成移码并提前出现终止密码子,从而影响蛋白结构和功能,导致疾病发生。

无义介导的 mRNA 降解 (nonsense-mediated mRNA decay, NMD) 是人类消除异常剪接所致异常蛋白积聚的主要机制之一^[13],在基因转录翻译过程中,当出现提前终止密码子时,机体会识别这些异常剪接产物并将其降解,以减少基因的错误表达^[14]。例如,有文献报道在一名泰国地中海贫血患者中检出 *HBB*:c.129delT 移码突变^[15],理论上患者应出现较严重症状,但该患者症状却异常轻微,随后作者通过体外细胞水平实验,发现突变体 mRNA 出现极大程度的降解,作者推测患者机体可能通过 NMD 机制,将带有终止密码子的突变 mRNA 大量降解,从而阻止潜在截短蛋白的产生^[16]。在本家系中,先证者存在 *CLN6*:c.486+2T>C 和 c.486+4A>T 复合杂合突变,同时也分别检出了异常剪接体,说明这两种突变均可导致剪接异常。其父母均为携带者,却未检出异常剪接体,推测可能是因为父母均存在一条正常等位基因。突变虽可导致剪接异常,但 NMD 的发生使得异常转录本在体内的丰度远远低于正常转录本,而 TA 克隆挑取单克隆测序的方法尚不足以检出异常剪接体;而在先证者中,两个等位基因表达丰度同时降低,异常转录本的占比反而更为平衡,故均可被检测到。因此,我们认为,对于隐性遗传病的剪接研究,纯合子或复合杂合子可能优于携带者。

综上所述,本例家系先证者检出 *CLN6*:c.486+2T>C 和 c.486+4A>T 复合杂合突变,并在 mRNA 水平检出两种异常剪接体,理论上很可能影响蛋白质的结构和功能,提示为本家系先证者的致病原因。本研究可为该家系遗传咨询及再生育指导提供分子病理学依据,新突变基因的发现也扩大了该基因的突变谱。

参考文献

- [1] BEST H L, NEVERMAN N J, WICKY H E, et al. Characterisation of early changes in ovine *CLN5* and *CLN6* Batten disease neural cultures for the rapid screening of therapeutics [J]. *Neurobiol Dis*, 2017, 100:62-74.
- [2] GUERREIRO R, BRAS J T, VIEIRA M, et al. *CLN6* disease caused by the same mutation originating in Pakistan has varying pathology [J]. *Eur J Paediatr*

- Neurol,2013,17(6):657-660.
- [3] HALTIA M, GOEBEL H H. The neuronal ceroid-lipofuscinoses: a historical introduction[J]. **Biochim Biophys Acta**,2013,1832(11):1795-1800.
- [4] CHIN J J, BEHNAM B, DAVIDS M, et al. Novel mutations in CLN6 cause late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis without visual impairment in two unrelated patients[J]. **Mol Genet Metab**,2019,126(2):188-195.
- [5] SUN G, YAO F, TIAN Z, et al. A first CLN6 variant case of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis caused by a homozygous mutation in a boy from China: a case report[J]. **BMC Med Genet**,2018,19(1):177.
- [6] SATO R, INUI T, ENDO W, et al. First Japanese variant of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis caused by novel CLN6 mutations [J]. **Brain Dev**,2016,38(9):852-856.
- [7] LEE H G, YOON B, KIM Y O, et al. CLN6 mutation in a patient with progressive myoclonus epilepsy[J]. **J Korean Child Neurol Soc**,2018,26:123-127.
- [8] 任守臣,高宝勤,王雅洁,等. 神经元蜡样脂褐质沉积病五例的临床表现、基因与超微病理特点[J]. **中华医学杂志**,2016,96(43):3504-3507.
REN Shoucheng, GAO Baoqin, WANG Yajie, et al. Clinical, genetic and pathological features of neuronal ceroid lipofuscinosis in 5 Chinese patients [J]. **National Medical Journal of China**,2016,96(43):3504-3507. (in Chinese)
- [9] TEIXEIRA C A, ESPINOLA J, HUO L, et al. Novel mutations in the CLN6 gene causing a variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis [J]. **Hum Mutat**,2003,21(5):502-508.
- [10] MAQUAT L E. Nonsense-mediated mRNA decay and human disease: Genome guardian and executor[J]. **FASEB J**,2018,32(1 supplement):99.91.
- [11] NASIF S, CONTU L, MÜHLEMANN O. Beyond quality control: The role of nonsense-mediated mRNA decay (NMD) in regulating gene expression [J]. **Semin Cell Dev Biol**,2018,75:78-87.
- [12] BROGNA S, WEN J. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms [J]. **Nat Struct Mol Biol**,2009,16(2):107-113.
- [13] 柴宝峰,王 美,石文鑫,等. 无义 mRNA 降解途径的机制与进化[J]. **山西大学学报(自然科学版)**,2017,40(3):639-644.
CHAI Baofeng, WANG Mei, SHI Wenxin, et al. Mechanism and evolution of nonsense-mediated mRNA decay [J]. **Journal of Shanxi University (Natural Science Edition)**,2017,40(3):639-644. (in Chinese)
- [14] 胡建燃,李 平. NMD 机制及其对人类遗传病的治疗意义[J]. **生命科学研究**,2016,20(6):535-541.
HU Jianran, LI Ping. Mechanism of NMD and its potential therapeutic significance for human genetic diseases[J]. **Life Science Research**,2016,20(6):535-541. (in Chinese)
- [15] VIPRAKASIT V, CHINCHANG W. Identification of hemoglobin YALA; a novel β thalassemia mutation due to thymidine deletion of codon 42 (-T) causing $\beta 0$ thalassemia and its interaction with hemoglobin E [C]. **Australia: Proceedings of the Annual Scientific Meetings of the HAA Sydney**,2011.
- [16] FORSTER L, ARDAKANI R M, QADAH T, et al. The effect of nonsense mediated decay on transcriptional activity within the novel β -thalassemia mutation HBB: c.129delT[J]. **Hemoglobin**,2015,39(5):334-339.

[本文编辑 沈 敏 余 方]