

一个非综合征性遗传性耳聋家系中 MYO7A 基因的突变分析*

刘嘉¹ 丁艳¹ 胡亚¹

[摘要] 目的:对一个非综合征性遗传性耳聋家系进行遗传学分析,查找该疾病的致聋性突变。方法:对该耳聋家系成员进行病史采集、听力、视力、基因组全外显子测序法检查分析,Sanger 测序验证。结果:在 MYO7A 基因发现两个突变位点,分别为 c. 1183C>T、1496T>C,其中 c. 1183C>T 有少量国外文献报道,1496T>C 为新发现的突变位点。根据 ACMG 变异指南分析显示这两个突变为该先证者的致病突变。经 Sanger 测序分析验证,c. 1183C>T 来源于父亲,1496T>C 来源于母亲。先证者及其弟弟听力检查结果均符合极重度感音神经性聋。在 ESP6500 数据库、千人基因数据库、Gnomad 数据库中正常对照人群中均未发现这两个突变位点。结论:发现一个新的 MYO7A 基因致病性复合杂合突变,为 MYO7A 基因变异导致常染色体隐性遗传性非综合征性耳聋提供了更多的诊断依据,丰富了 MYO7A 基因突变谱,可提高对基因突变携带者高风险家庭的产前诊断率,减少出生缺陷。

[关键词] MYO7A 基因;非综合征性遗传性耳聋;基因测序;突变检测

DOI:10.13201/j.issn.2096-7993.2022.01.006

[中图分类号] R764.43 **[文献标志码]** A

Identifications of the novel mutants on MYO7A in a family with non-syndromic hereditary deafness

LIU Jia DING Yan HU Ya

(Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, 410011, China)

Corresponding author: DING Yan, E-mail: 411321809@qq.com

Abstract Objective: To identify the deaf-causing mutation by the genetic analysis in a family with non-syndromic hereditary deafness. **Methods:** Medical history collection, hearing, vision, and genome whole-exome sequencing were performed on the members of the deaf family. **Results:** Two mutation sites were identified in the MYO7A gene, namely c. 1183C>T and 1496T>C, of which c. 1183C>T has a small number of foreign literature reports, and 1496T>C is a newly discovered mutation site. According to ACMG mutation guideline showed that these two mutations were pathogenic mutations of the proband. Sanger sequencing verified that c. 1183C>T was derived from the father, and 1496T>C was derived from the mother. These two mutation sites were not found in the healthy population in the Exome Sequencing Project(ESP6500) database, 1000 Genomes Project database, and the Gnomad database. Moreover, the second child in this family included a heterozygous mutation of c. 1183C>T and 1496T>C and was confirmed to become severe sensorineural deaf. **Conclusion:** A new pathogenic compound heterozygous mutation in the MYO7A gene has been discovered, which provides more diagnostic evidence for the autosomal recessive non-syndromic deafness caused by the MYO7A gene mutation and improves the prenatal gene diagnosis in high-risk families for mutation carriers to reduce congenital disabilities.

Key words MYO7A gene; non-syndromic hereditary deafness; DNA sequencing; mutation detection

耳聋病因复杂,影响因素较多,大约 60% 的耳聋与基因有关^[1]。目前已知的耳聋基因有 200 余种^[2]。每 2000 个新生儿中就有 1 个患有遗传性听力障碍,约 70% 是非综合征性遗传性耳聋。目前发现可导致常染色体隐性遗传性非综合征性耳聋的相关基因约 90 多个,其中 MYO7A 基因是常见的与遗传性耳聋有关的热点基因,该基因位于第 11 条染色体上,其致病性突变约有 90 多种^[3],突

变位点分布比较广泛,外显子和内含子均可发生突变。1995 年 Weil 等^[4]分离并鉴别出此基因,MYO7A 基因由 49 个外显子组成,跨越大约 114 kb 的基因组 DNA,该基因编码一个由 2215 个氨基酸组成的肌球蛋白,该肌球蛋白遗传性高度保守,在内耳、前庭、视网膜等多处都有表达^[5]。在内耳该基因主要表达于静纤毛;在视网膜中,该基因主要表达于视网膜色素上皮和光感细胞。MYO7A 基因的突变最常导致以听力损失、视网膜病变、前庭功能障碍为表型的 Usher 综合征,也可引发单纯性的隐性遗传性耳聋。本研究在一个家系中发现

*基金项目:湖南省科技创新计划项目(No:2018SK52513)

¹中南大学湘雅二医院耳鼻咽喉头颈外科(长沙,410011)

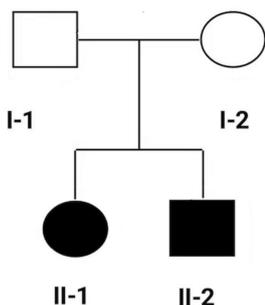
通信作者:丁艳,E-mail:411321809@qq.com

了 MYO7A 基因的复合杂合突变 c. 1183C>T、1496T>C, 其中 1496T>C 属于新发现的突变位点, 拓展了 MYO7A 基因的突变谱。

1 对象与方法

1.1 研究对象

研究对象为先证者及其家族成员, 先证者为 4 岁半女童, 家系成员包括其父母和一个弟弟。先证者出生时新生儿听力筛查右耳未通过, 左耳通过, 出生 1 个月复查听力筛查双耳均未通过。1 岁半时发现其对声音反应不敏感, 就诊当地医院, 最终诊断为极重度感音神经性聋。2 年后父母怀二胎, 孕 20 周时于中国人民解放军总医院聋病分子诊断中心行羊水穿刺致病基因检测, 足月后生下一男婴, 出生时听力筛查双耳均通过, 家长通过日常观察, 定期儿保检查发现其对声音反应良好, 生长发育在正常范围内; 出生后第 9 个月, 家长发现其有听力下降, 就诊中南大学湘雅二医院耳鼻咽喉头颈外科, 最终诊断为极重度感音神经性聋。家系谱图见图 1。



I-1 和 I-2 分别为先证者父亲和母亲, 听力均正常; II-1 为先证者, II-2 为先证者弟弟, 均表现为听力障碍。

图 1 家系谱图

1.2 研究方法

本研究获得医院伦理委员会批准, 研究对象均签署了知情同意书, 未成年人由监护人签署知情同意书。

听力检测: 采用 Madsen Astera 听力计进行纯音测听检查, 采用 Madsen zodiac 进行声导抗检查, 采用 Madsen capella 进行耳声发射检查, 采用 Neuro-Audio 进行听性脑干诱发电位检查; 眼科检查: 视力、眼压、视野、眼底检查; 影像学检查: 颞骨高分辨 CT, 头部及耳部 MRI 检查。

采集先证者及其父母、弟弟静脉血, 提取

DNA, 并测定浓度。

芯片捕获高通量测序(由深圳华大临床检验中心完成): 将 DNA 打断, 制备文库, 通过芯片对目标基因外显子及邻近剪切区的 DNA 进行捕获和富集, 使用高通量测序平台对全外显子组进行变异检测。进行线粒体全基因突变检测和 miRNA 区域检测。Sanger 测序验证突变位点; 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, 对产物进行测序分析。进行致病性预测分析、保守性分析和蛋白质结构模型分析。

2 结果

2.1 家系表型特征

该家系 4 人, 先证者及其弟弟表现为听力障碍, 父母听力表现正常, 系谱分析符合常染色体隐性遗传特征。

2.2 耳科检查结果

家系成员颞骨高分辨 CT 及头部 MRI 均未发现异常。先证者父母纯音测听检查平均听阈 < 25 dBnHL, 声导抗双侧鼓室图“ A ”型, 耳声发射畸变产物均可引出, 听性脑干诱发电位检查阈值为 30 dBnHL; 先证者及其弟弟声导抗双侧鼓室图“ A ”型, 耳声发射畸变产物均未引出, 听性脑干诱发电位检查 100 dBnHL 未引出相关反应波, 多频稳态 500、1000、2000、4000 Hz 平均阈值反应点在 100 dBnHL 左右。先证者佩戴助听器助听后平均听阈为 40 dBHL, 对声音反应良好, 言语识别率为 90%。先证者及其弟弟确诊为极重度感音神经性听力损失。

2.3 眼科检查结果

家系成员视力、眼压、视野、眼底检查均无异常。

2.4 基因检测结果

2.4.1 芯片捕获高通量测序 结果发现先证者 MYO7A 基因存在 c. 1183C>T、1496T>C 两个可疑突变(图 2)。

2.4.2 线粒体全基因突变检测和 miRNA 区域检测 均未发现突变。

2.4.3 Sanger 测序结果 经 Sanger 测序验证显示 c. 1183C>T 突变遗传自父亲, 1496T>C 突变遗传自母亲。母亲在二胎孕期行羊水穿刺, 检测出 c. 1183C>T/1496T>C 复合杂合突变, 先证者及其弟弟血清基因检测同样存在相应的复合杂合突变(表 1, 图 3)。

表 1 家系基因型

基因	遗传方式	突变信息	I-1	I-2	II-1	II-2
MYO7A	常染色体隐性遗传	NM-000260.3;c.1183C>T(p.Arg395Cys)	杂合突变	无突变	杂合突变	杂合突变
MYO7A	常染色体隐性遗传	NM-000260.3;c.1496T>C(p.Ile499Thr)	无突变	杂合突变	杂合突变	杂合突变

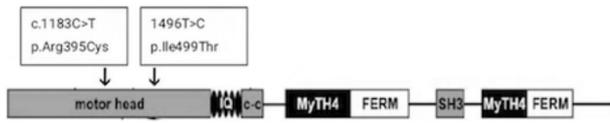
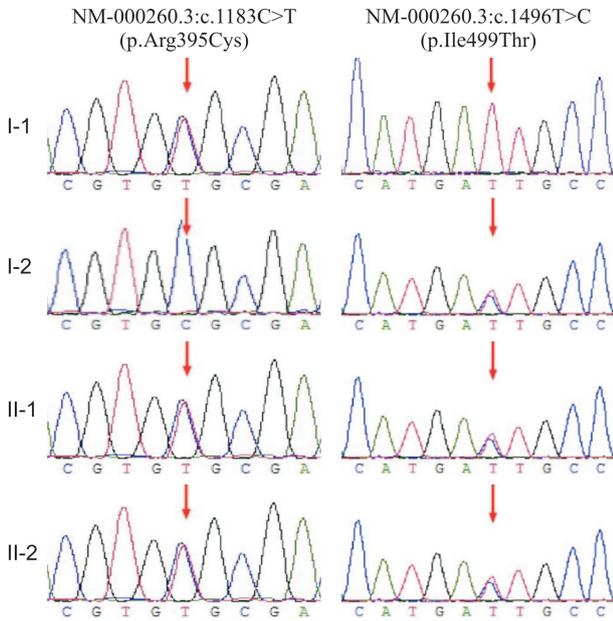


图 2 Myosin VII A 蛋白结构示意图显示两个突变所在结构域位置



先证者 (II-1) 及其弟弟 (II-2) MYO7A 基因存在位点 1/位点 2 复合杂合突变, 基因型与表型共分离。

图 3 家系 Sanger 测序结果

2.5 位点致病性预测分析及保守性分析

本研究中涉及的 MYO7A 基因 c.1183C>T (p.Arg395Cys) 变异, 已有该变异致病性的相关报道, 依据 ACMG 指南, 该变异被判断为疑似致病变异 (PM1+PM2+PP4+PM3-Support+PP1-Moderate), 证据如下:

PM1: 位于热点突变区域, 和/或位于已知无良性变异的关键功能区域; PM2: ESP6500 数据库、千人基因数据库、Gnomad 数据库中正常对照人群中未发现的变异 (或隐性遗传病中极低频位点), 人群频率: ESP6500:-, 千人基因组:-, Gnomad: 2.36538e-05; PP4: 变异携带者的表型或家族史高

度符合某种单基因遗传疾病; PM3-Support: PM3 降级情况; PP1-Moderate: PP1 升级情况。

另一个 MYO7A 基因 c.1496T>C (p.Ile499Thr) 变异, 目前没有该变异致病性的相关报道。依据 ACMG 指南, 该变异被判断为意义未明变异 (PM2+PP3), 证据如下:

PM2: ESP6500 数据库、千人基因数据库、Gnomad 数据库中正常对照人群中未发现的变异 (或隐性遗传病中极低频位点), 人群频率: ESP6500:-, 千人基因组:-, Gnomad:-; PP3: 多种统计方法预测出该变异会对基因或基因产物造成有害影响, 包括保守性预测、进化预测、剪切位点等影响。软件预测结果 SIFT: D, Condel: deleterious, Mutation Taster: D, Polyphen2: D, PhyloP: 保守, GERP++: -, dbSNV-RF:-。

我们对 MYO7A 基因 1183C>T (p.Arg395Cys) 和 1496T>C (p.Ile499Thr) 位点氨基酸用 DNA Man 软件进行不同物种同源序列对比, 发现以上两个突变点在人 (Homo sapiens)、黑猩猩 (Pan troglodytes)、猕猴 (Macaca mulatta)、狗 (Canis lupus)、牛 (Bos taurus)、家鼠 (Mus musculus)、褐家鼠 (Rattus norvegicus)、原鸡 (Gallus)、斑马鱼 (Danio rerio)、果蝇 (Drosophila melanogaster) 及爪蟾 (Xenopus tropicalis) 多物种之间高度保守 (图 4)。

2.6 蛋白质结构模型分析

本研究涉及的 MYO7A 基因的两个突变为 1183C>T 和 1496T>C, 其中 1183C>T 导致第 395 位精氨酸替换为编码半胱氨酸, 1496T>C 导致第 499 位异亮氨酸替换为编码苏氨酸。我们用 Discovery studio client 软件分析突变位点氨基酸相关结构的改变 (图 5), 野生型 MYO7A 中 395 位 Arg 与 329 位 Gly 之间形成了非常强的氢键作用 (图 5a), Ile499 与 PHE456 之间也形成了较强的疏水作用 (图 5c); 但是突变后 Arg395 突变为 Cys395, 其与 Gly329 之间的相互作用消失了 (图 5b), 同样, Ile499 突变为 Thr499 后, 其与 Phe456 之间的疏水作用也消失了, 作用力减少 (图 5d)。

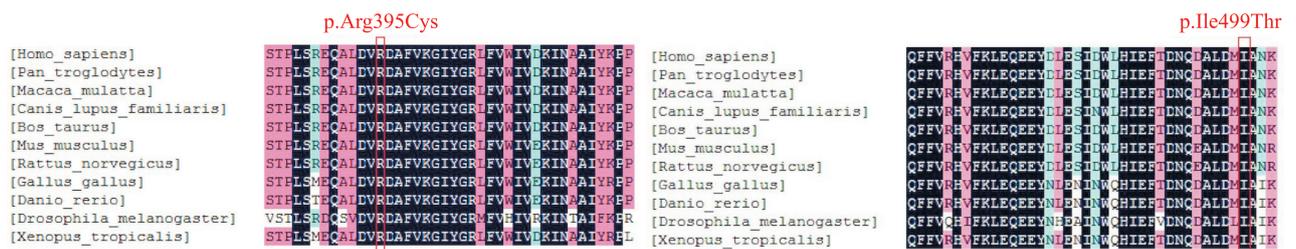
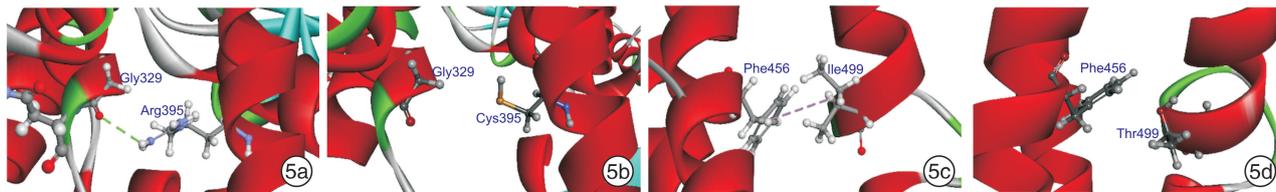


图 4 突变位点保守性分析



5a:野生型 MYO7A 蛋白部分 3D 结构模型图;5b:MYO7A 蛋白 c. 1183C>T(p. Arg395Cys)突变位点部分 3D 结构模型图;5c:野生型 MYO7A 蛋白部分 3D 结构模型图;5d:MYO7A 蛋白 c. 1496T>C(p. Ile499Thr)突变位点部分 3D 结构模型图。

图 5 蛋白质结构模型

3 讨论

MYO7A 编码的蛋白为 myosin VII A,该蛋白属于非传统的肌球蛋白,利用 ATP 水解产生的能量沿肌动蛋白丝运动。该蛋白主要由马达头部基序(氨基酸 1-729)、颈部区域(氨基酸 730-855)和长尾(氨基酸 856-2215)三部分组成。其中长尾部分包括卷曲线圈 c-c 结构域(氨基酸 848-1095)、src 同源 3 结构域(SH3)、两个由 MYTH4 和 FERM 组成的重复序列(图 4)。MYO7A 基因突变位点在马达区域、IQ 基序、MyTH4 结构域、FERM 结构域和 SH3 结构域均有分布^[6]。在内耳,myosin VII A 参与膜结合元素到静纤毛肌动蛋白核心的锚定,是静纤毛传感器通道正常门控所必需的。Boëda 等^[7]已证明,myosin VII A 与 Harmonin 直接相互作用,并传递 Harmonin b 确保钙粘蛋白 23 锚定在肌动蛋白核心上,从而间接调节静纤毛中传感器通道的门控特性。在 myosin VII A 突变的 shaker-1 小鼠模型中,有研究发现严重的突变(大片段缺失、移码、剪接、无义、复制与倒位重排等)不但会影响耳蜗毛细胞表面静纤毛的功能,而且能破坏静纤毛正常形态,而较轻的突变(点突变、错义突变等)则不会引起毛细胞形态的改变,但仍然导致听力下降,这表明 myosin VII A 除了影响静纤毛的正确形态外,还影响毛细胞的功能。所以不同程度的突变影响听力损失的程度也不同,MYO7A 基因突变导致听力损失的表型上呈现多样性,既可以表现为中重度听力损失,也可以表现为极重度听力损失,听力损失的病程既可以是渐进性的,也可是先天性的,听力损失的类型既可以高频听力下降为主,也可以低频听力下降为主。

MYO7A 基因突变引起的常见疾病为 Usher 综合征^[8-9],部分突变可导致常染色体显性遗传性耳聋(DFNA11)和常染色体隐性遗传性耳聋 2 型(DFNB2)。Usher 1B 是最常见的 MYO7A 基因突变引起的遗传性耳聋,其症状表现为先天性重度听力缺陷和言语发育障碍、早发型视网膜色素变性(一般 10 岁前表现出来)以及前庭功能障碍。基因纯合或复合杂合突变均可导致 DFNB2 的发生。DFNB2 与 Usher 综合征最大的区别是无视觉、前

庭方面的症状,但 Astuto 等^[10]认为对于 DFNB2 的研究一定要跟踪随访视觉检查,并认为 DFNB2 与 Usher 1B 为同一疾病的不同发展阶段,最终 DFNB2 都会发展为 Usher 1B 综合征。

本研究中的两个突变点均位于 myosin VII A 头部马达区域。Su 等^[11]对 231 例非综合征性耳聋患者进行筛查,发现位于头部的马达区域是导致非综合征性耳聋的主要病变区域,其突变可严重影响 myosin VII A 的功能。本研究通过靶向捕获二代测序技术对一个耳聋小家系成员进行全基因外显子测序和数据分析对比,发现了 MYO7A 基因的两个突变 1183C>T(p. Arg395Cys)、1496T>C(p. Ile499Thr)。经一代测序验证两个突变分别来自先证者父母,而父母无相似临床表现,符合常染色体隐性遗传。其中 MYO7A c. 1183C>T(p. Arg395Cys)变异国外已有相关报道,Naz 等^[12]在一个耳聋家系中发现 7 个人带有 c. 1183C>T(p. Arg395Cys)突变,纯音测听 500~4000 Hz 平均听阈在 85~95 dBnHL,c. 1183C>T(p. Arg395Cys)位于 MYO7A 基因的马达区,当 ARG395 突变为 CYS395,其与 GLY329 之间氢键作用消失,可能会导致其后的氨基酸残基缺失,从而影响 myosin VII A 蛋白的重要功能^[13-14]。依据 ACMG 指南,该变异被判断为疑似致病变异(PM1+PM2+PP4+PM3-Support+PP1-Moderate)。MYO7A c. 1496T>C(p. Ile499Thr)突变目前没有该变异的相关报道。当 ILE499 突变为 THR499 后,其与 PHE456 之间的疏水键作用消失,依据 ACMG 指南,该变异被判断为意义未明变异(PM2+PP3)。多种统计方法预测该变异会对基因或基因产物造成有害的影响,软件预测结果 SIFT:D,Condel:deleterious, Mutation Taster:D, Polyphen2:D, PhyloP:保守。蛋白质结构模型分析这两个突变位点可能是致病的原因,生物信息学分析结果显示这两个位点在多物种中高度保守,推测这些位点可能发挥重要作用。为了进一步验证,我们已经开展后续的研究工作,利用 CRISPR/Cas9 技术,在模式动物斑马鱼上构建这两种点突变的模型。模型建好后,将这两种点突变斑马鱼进行杂交,模拟人类的复合杂合突变

模型,并进一步验证其听力功能,验证成功后,我们将进一步进行转录组、蛋白质组以及 qPCR、Western Blot 验证,对 MYO7A 隐性遗传耳聋中的作用及分子调控机制进行更深入的研究。基因治疗目前是生命科学发展的前沿手段,有研究表明,在复合杂合突变致聋的病例中,矫正其中某一个突变位点,可使病变的毛细胞功能恢复正常。

本研究中先证者出生时听力筛查有单侧耳通过的现象,后父母未及时跟踪其听力变化,1岁半时发现其对声音反应不良;先证者弟弟9个月时发现听力反应减退,推测本研究中的复合杂合突变导致的听力损失可能具有迟发性的特点。先证者佩戴助听器后,平均听阈为 40 dBHL,言语分辨率为 90%,对声音反应良好,结合颞骨高分辨 CT 及头部和耳部 MRI 检查结果均正常的情况,推测该复合杂合突变导致的听力损失病变位置为耳蜗毛细胞,印证了 MYO7A 基因在内耳毛细胞的表达。同时先证者及家人前庭及视觉检查均未发现异常,只表现为单纯性的耳聋症状,说明本研究中的两个突变导致了内耳功能受损,而视网膜功能没有受到影响;也可能在内耳,该蛋白质功能是独特的,不能由其他蛋白质补偿,而在视网膜中,其他补充性蛋白质可能减轻眼内 myosin VII A 蛋白质部分功能丧失导致的病变。对于基因型和表型分析表明本研究中的突变可能导致了 DFNB2,但根据 Astuto 的观念,因先证者及其弟弟年龄均小于 10 岁,目前虽没有发现前庭及眼部的病变,但并不能完全排除 Usher 1B 患病的可能,应进一步跟踪监测其视力、前庭功能的变化。

先证者母亲在二胎孕期时羊水检测出了 MYO7A 基因复合杂合突变,先证者弟弟出生后血清检测出相应的 MYO7A 基因复合杂合突变,且表型表现为迟发性听力损失,进一步说明羊水穿刺作为一种产前基因检测技术与血清基因诊断结果高度吻合,可作为一种产前基因筛查手段检测耳聋基因的病变。

本研究明确了一个耳聋家系的遗传学病因,并丰富了 MOY7A 基因突变谱,为常染色体隐性遗传非综合征性耳聋的遗传咨询及产前诊断提供了依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 周永安,王湘,马云霞,等. 遗传性非综合征性常见耳

聋基因诊断的研究[J]. 中国优生与遗传杂志,2011,19(7):27-30,39.

- [2] 张昊昱,张宁,张华,等. 耳聋基因检测在遗传性耳聋诊断及遗传咨询中的应用[J]. 中华耳科学杂志,2016,14(5):639-643.
- [3] 孙艺,袁慧军,王荣光. MYO7A 基因突变与遗传性耳聋[J]. 中华耳科学杂志,2010,8(1):63-67.
- [4] Weil D, Blanchard S, Kaplan J, et al. Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B [J]. Nature, 1995, 374(6517):60-61.
- [5] Luijeindijk MWJ, van Wijk E, Bischoff AMLC, et al. Identification and molecular modelling of a mutation in the motor head domain of myosin VIIA in a family with autosomal dominant hearing impairment (DFNA11)[J]. Hum Genet, 2004, 115(2):149-156.
- [6] Wolfrum U, Nagel-Wolfrum K. [The Usher Syndrome, a Human Ciliopathy][J]. Klin Monbl Augenheilkd, 2018, 235(3):273-280.
- [7] Boëda B, El-Amraoui A, Bahloul A, et al. Myosin VIa, harmonin and cadherin 23, three Usher I gene products that cooperate to shape the sensory hair cell bundle[J]. EMBO J, 2002, 21(24):6689-6699.
- [8] 张会敏,陈森,孙宇,等. 聋病基因诊断在评估人工耳蜗植入术预后中的价值[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2021, 35(3):274-281.
- [9] 郭敏,韩炜伟,李书聆. Usher1C 新发突变致先天性感音神经性聋 1 例并文献复习[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2020, 34(6):562-564.
- [10] Astuto LM, Kelley PM, Askew JW, et al. Searching for evidence of DFNB2[J]. Am J Med Genet, 2002, 109(4):291-297.
- [11] Su MC, Yang JJ, Su CC, et al. Identification of novel variants in the Myosin VIIA gene of patients with nonsyndromic hearing loss from Taiwan[J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2009, 73(6):811-815.
- [12] Naz S, Imtiaz A, Mujtaba G, et al. Genetic causes of moderate to severe hearing loss point to modifiers[J]. Clin Genet, 2017, 91(4):589-598.
- [13] Shahzad M, Sivakumaran TA, Qaiser TA, et al. Genetic analysis through OtoSeq of Pakistani families segregating prelingual hearing loss[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2013, 149(3):478-487.
- [14] Richard EM, Santos-Cortez R, Faridi R, et al. Global genetic insight contributed by consanguineous Pakistani families segregating hearing loss[J]. Hum Mutat, 2019, 40(1):53-72.

(收稿日期:2021-07-26)