



Leber 先天性黑蒙症分子机制研究新进展及未来展望

魏天颖^①, 祁鸣^{①②③*}

① 浙江大学医学部基础医学院, 杭州 310058;

② 浙江大学医学院附属第一医院和沃森基因组科学研究院, 杭州 310003;

③ Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Rochester, Rochester 14642, USA

* 联系人, E-mail: mingqi@zju.edu.cn

2013-01-11 收稿, 2013-04-02 接受, 2013-10-17 网络版发表

摘要 Leber 先天性黑蒙症是一种严重的遗传性视网膜病变, 常在婴幼儿时期发病, 并伴有糖尿病、肥胖和尿崩症等一系列并发症, 目前尚无特效药可以治疗. 之前的一系列研究发现, 有 17 个基因和 Leber 先天性黑蒙症相关. 但是这 17 个基因仅能解释 70% 左右的先天性黑蒙症的发病机制, 本实验室(Ming Qi 实验组)及其他三个实验组(Jean-Michel Rozet 实验组、Eric A Pierce 实验组、Rui Chen 实验组)最新发表在 *Nat Genet* 上的 4 篇论文揭示出 *NMNAT1* 基因也是 Leber 先天性黑蒙症的致病基因. 这一发现解释了部分 Leber 先天性黑蒙症的遗传学机制, 也为后期 Leber 先天性黑蒙症的诊断和基因治疗提供了理论依据.

关键词

Leber 先天性
黑蒙症
NMNAT1
基因治疗

1 Leber 先天性黑蒙症的临床特点

Leber 先天性黑蒙症(LCA)是德国眼科医师 Theodor Leber 于 1869 年首先报道的^[1], 属于最严重的遗传性视网膜病变, 可导致婴儿在出生后一个月内完全丧失视力^[2]. 多呈常染色体隐性遗传, 也有部分报道认为其为常染色体显性遗传. 约有 10%~20% 的盲校儿童是 LCA 患者, 占遗传性视网膜疾病的 5% 以上^[2]. LCA 除了导致婴幼儿先天性失明外, 还伴有一系列的严重并发症, 如神经性耳聋、肥胖、糖尿病、尿崩症、性腺功能低下、高尿酸血症及高甘油三酯血症等. 早期眼底检查可无异常或有轻微色素沉着, 伴有搜索样眼球震颤和瞳孔对光反射迟钝^[3], 呈现黑蒙性瞳孔或者熄灭性视网膜电图波形. 晚期出现椒盐样色素和骨细胞样色素沉积, 视网膜电图检测到无波形或波幅严重降低等症状^[4]. 除此之外, LCA 患者还可能出现眼球内陷、圆锥形角膜和白内障等异常现象^[5].

2 前期研究发现的 Leber 先天性黑蒙症致病基因

利用连锁分析、基因定位和候选基因筛选等技术^[5], 多年来人们一共发现了 17 个基因与 LCA 相关, 分别命名为 *AIPL1*, *CABP4*, *CEP290*, *CRB1*, *CRX*, *GUCY2D*, *IQCB1*, *LCA5*, *LRAT*, *RD3*, *RDH12*, *RPE65*, *RPGRIP1*, *SPATA7*, *TULP1*, *IMPDH1* 和 *OTX2*^[6], 这些基因在不同人群中的分布频率存在着相当大的差距. 其中, *CEP290*, *GUCY2D*, *CRB1*, *IMPDH1*, *RPE65*, *AIPL1* 和 *RPGRIP1* 是最常见的致病基因, 占有 LCA 病例的 50%~60%^[7]. 但是, 这 17 个基因仅可以解释大约 70% 的 LCA 病因^[8], 仍有许多临床病例没有找到相应的分子理论依据, 提示还有未被发现的 LCA 致病基因. 17 种基因的基本信息见表 1.

3 Leber 先天性黑蒙症的治疗方法

目前, 临床上没有特异治疗 Leber 先天性黑蒙症

引用格式: 魏天颖, 祁鸣. Leber 先天性黑蒙症分子机制研究新进展及未来展望. 科学通报, 2013, 58: 3770–3776

Wei T Y, Qi M. Research progress and prospects in molecular mechanisms of Leber congenital amaurosis (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2013, 58: 3770–3776, doi: 10.1360/972013-54

表 1 前期研究发现的 17 个基因基本信息

基因名称	基因位置	编码蛋白质数目	外显子数目	蛋白质基本功能
<i>CRB1</i>	1q31.3	1376	12	组成视网膜支架或者阻断正常细胞凋亡, 影响光感受器发育
<i>RD3</i>	1q32.3	195	3	未知
<i>RPE65</i>	1q31.3-31.2	533	14	结合全反式视黄酯, 维持视网膜色素再循环
<i>IQCB1</i>	3q13.3	598	15	与钙调蛋白相互作用调节 RPGR 活性
<i>LRAT</i>	4q32.1	230	3	催化 mRPE65 转化为 sRPE65
<i>LCA5</i>	6q14.1	697	9	蛋白质转运
<i>TULP1</i>	6q21.31	489	15	参与蛋白质运输尤其是视紫红质
<i>IMPDH1</i>	7q32.1	514	17	鸟嘌呤核苷酸的从头合成的限速酶
<i>CABP4</i>	11q13.2	275	6	改变超极化电压通道的活力并且和 CACNA1F 相关
<i>CEP290</i>	12q21.32	2479	55	纤毛的装配和运输
<i>RDH12</i>	14q24.1	316	7	双特异性视黄醇脱氢酶, 维生素 A 循环
<i>RPGRIP1</i>	14q11.2	612	24	蛋白质转运
<i>SPATA7</i>	14q31.3	567	12	未知
<i>OTX2</i>	14q22.3	297	5	调节感光细胞发育, 维护 GnRH 神经元的发育和表达
<i>AIPL1</i>	17p13.1	384	6	与法尼基化蛋白相互作用, PDE 分子伴侣
<i>GUCY2D</i>	17p13.1	1103	20	光感受器特异环化酶, 水解 cGMP
<i>CRX</i>	19q13.33	299	4	光感受器特异性转录因子, 维护光感受器功能

的药物, 但是由于先天性黑蒙症有一系列严重并发症, 如糖尿病、尿崩症、性腺功能低下、高尿酸血症及高甘油三酯血症等。因此, 需要用相关的药物来缓解症状, 维持患者正常机能。随着科学技术的进步, 人们开始把治疗 Leber 先天性黑蒙症的希望寄托于基因疗法上, 并且取得了一定的成效。特别是 *RPE65*, *RPGRIP1*, *AIPL1* 和 *GUCY2D* 这 4 个基因引发的 Leber 先天性黑蒙症, 基因治疗已经获得了初步的成果。

3.1 *RPE65* 的基因治疗

RPE65 基因的主要功能是结合全反式视黄酯, 使之转化为 11-顺-视黄醛, 进而合成为视紫红质^[5,9,10]来维持视网膜色素再循环的过程。因此, 当 *RPE65* 基因失去功能, 视网膜的光感受细胞就会因缺乏视紫红质而不能对光发生反应^[5,11], 导致视力丧失。在所有的 Leber 先天性黑蒙症的病例中, *RPE65* 基因突变导致的病例大约占 15%^[8], 因此, *RPE65* 的基因治疗至关重要。针对这一情况, 美国费城儿童医院眼科的 Maguire 等人^[12]设计了包含 *RPE65* 互补 DNA(cDNA) 的重组腺病毒伴随病毒(AAV)载体, 通过视网膜下腔注射, 让没有缺陷的 DNA (AAV2-hRPE65v2)直接进入病人的眼部, 在视网膜下腔后面产生感光色素, 取

代表失功能的色素, 从而恢复眼部的光敏性。实验组选取 12 名年龄 8~44 岁不等的 LCA 患者, 经过治疗, 近一半患者恢复了光明, 并且实验证明年纪越小, 治疗效果越好^[13]。这一实验证实了基因治疗的可行性, 因此, 其他机制 LCA 病例的基因治疗研究也在广泛开展。当然, 基因治疗的长期效果及可能出现的后遗症还需要时间来验证, 但是相信随着科学的进步, 这一技术会更加成熟, 最终广泛应用于临床上。

3.2 *GUCY2D* 和 *AIPL1* 的基因治疗

GUCY2D 基因编码的蛋白质是一种光感受器特异环化酶, 使感光细胞的 cGMP 水平在受到刺激后可以顺利恢复正常。因此, *GUCY2D* 基因突变的细胞在受到光刺激后 cGMP 的水平无法恢复, 从而导致 cGMP 不足, 感光细胞长期处于极化状态^[5,10], 引发失明。而 *AIPL1* 基因编码的产物则可以增强 cGMP-PDE-α 法尼酰化, 降低机体 cGMP 水平。因此 *AIPL1* 基因突变后, 会导致感光细胞内 cGMP 水平过高, 细胞快速变性失去功能^[5]。目前, *GUCY2D* 突变和 *AIPL1* 基因突变引起的 LCA 基因治疗研究还处在动物实验过程中。主要利用的动物模型是鸡和小鼠等, 研究人员通过病毒载体将 *GUCY2D* 或者 *AIPL1* 基因

的 cDNA 片段导入后,可以明显观察到 cGMP 的水平趋于正常,动物的视觉水平得到改善.但是,要将这一实验用于临床治疗还需要进一步的研究.

3.3 *RPGRIP1* 基因治疗 LCA 的研究

RPGRIP1 基因编码的蛋白质是一种光感受器特异性蛋白,位于感光细胞内外节之间的连接纤毛结构上^[10].*RPGRIP1* 基因突变会引起感光细胞内外节连接障碍,损伤视网膜细胞的完整性,引起 LCA.与其他 2 个基因的治疗方法类似,将包含有 *RPGRIP1* 基因 cDNA 片段的 AAV 病毒载体注射入小鼠的视网膜下腔后,可明显发现小鼠感光细胞外节成熟度提高^[5],视力得到改善.

4 新发现的 LCA 致病基因

2012 年 7 月 29 日在线发表在 *Nat Genet* 杂志上的 4 篇文章宣布了本研究组及另外 3 个实验室同时发现 LCA 的新致病基因 *NMNAT1* 这一消息,这些研究成果为罕见“黑蒙症”的基因诊断、治疗及药物开发提供了一条新途径.*NMNAT1* (nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 1)即烟酰胺单核苷酸腺苷转移酶 1,由 4 个外显子组成,编码 279 个氨基酸.*NMNAT1* 在机体内广泛存在,对尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD^+)的生物合成过程起着重要作用^[14],可以催化 *N*-甲基烟酰胺(*N*-Mononucleotide, NMN)或者 NaMN 形成 NAD^+ .在此之前,人们对 *NMNAT1* 基因的研究主要集中于减缓神经变性、维持受损神经细胞生存的作用上.因此,人们主要将 *NMNAT1* 基因与帕金森综合征、阿尔兹海默症和肌肉萎缩征等神经退行性疾病相联系.本次,这 4 个实验组采用外显子组捕获和新一代高通量测序等方法,在不同人种中检测,分别找到了可以导致 LCA 的 *NMNAT1* 基因突变,首次将 *NMNAT1* 与眼科疾病联系到了一起.4 个实验室分别检测到的 *NMNAT1* 突变见表 2.

由表 2 可以看出,4 个研究组样本的来源及发现的突变都有很大的差异.这和各实验组使用的技术方法及研究对象有很大的关系.下面就 4 个研究组研究项目的异同进行比较分析.

4.1 4 个研究组最初研究对象和研究手段的异同

Qi 实验组是在收集了来自世界各地的 220 例

LCA 病例后进行筛查,其中有 50 例样本没有在前已知 17 个 LCA 基因中找到突变,提示着还有未被发现的 LCA 致病基因.因此,研究人员选取了一个没有发现已知突变的 LCA 患者进行外显子组捕获检测.经过分析,从 2460 个单核苷酸变异中发现有 10 个基因含有无义突变,其中包括 *NMNAT1* 在内的 5 个基因在视网膜中表达,而该病人的 *NMNAT1* 基因还发现另有一个的错义突变,符合常染色体隐性遗传模式,故而被选中为候选基因进行进一步的实验.为了确定 *NMNAT1* 是否为未被发现的 LCA 致病基因,研究人员对剩下的未发现已知突变的 LCA 患者进行了检测.又发现了另外 10 个患者携带有 *NMNAT1* 突变^[6],从而证实了之前的推测.Chen 实验组同样是在收集大量 LCA 患者后,用已知的 17 个基因进行筛查,得到未查出已知突变的病例.然后再使用新一代高通量测序技术进行检测,从而筛选出了 3 个不相关的带有 *NMNAT1* 突变的 LCA 患者.在此之后,研究人员同样选择进一步检测 150 个 LCA 患者的 *NMNAT1* 编码区域,来证实研究结果,在其中又发现了 4 例携带有 *NMNAT1* 突变的患者^[15].Rozet 实验组则与这 2 组不同,是直接选取了 5 例未找到已经突变的 LCA 病例进行外显子组捕获测序.经过结果分析,非常幸运的在其中找到了 2 例带有 *NMNAT1* 突变的病例.紧接着,实验组又使用 Sanger 测序法检测了 256 例未找到已知突变的 LCA 患者的 *NMNAT1* 基因,发现了另外 20 个带有 *NMNAT1* 突变的病例^[16].而 Pierce 实验组最初的研究对象是一个很大的近亲结婚巴基斯坦家族,这一家族有 5 个孩子患有 LCA,并且没有检测到携带已知的 17 种 LCA 致病突变.因此,研究组使用了外显子组捕获的方法检测了这个家族的一个 11 岁先证者,获得了 86 个基因的 113 个非同义替换突变,其中 4 个基因是在视网膜中表达的^[17].经过 SIFT 和 PloyPhen-2 等系统的分析,研究人员将目光集中在了其中一个基因上,就是 *NMNAT1* 基因.随后,研究人员检测了费城儿童医院和麻省(马萨诸塞州)医院眼科的 56 位没有亲属关系的 LCA 患者的 *NMNAT1* 基因,结果发现了另外 2 个 *NMNAT1* 突变的携带者.接下来,研究人员继续检测了大量来自不同种族的 LCA 样本以确定 *NMNAT1* 在 LCA 患者中的突变频率.这一检测,包括了来自巴黎德拉眼科医院、英国伦敦大学学院和印度 L.V.Prasad 眼科机构的 228 个病例,其中又发现了 11 个额外的携带 *NMNAT1* 突变的家族^[17].

表 2 4 个实验组分别检测到的 *NMNAT1* 突变^{a)}

基因突变	蛋白质改变	发现实验组	患者国籍
c.1A>G	p.Met1?	Jean-Michel Rozet	意大利
c.25G>A	p.Val9Met	Eric A Pierce	巴基斯坦
c.37G>A	p.Ala13Thr	Rui Chen, Jean-Michel Rozet, Eric A Pierce	海地、加勒比、法国
c.59T>A	p.Ile20Asn	Eric A Pierce	波兰
c.98A>G	p.Asp33Gly	Eric A Pierce	印度
c.104T>G	p.Met35Thr	Ming Qi	美国
c.161C>T	p.Ala54Val	Eric A Pierce	加勒比斯里兰卡混血
c.196C>T	p.Arg66Trp	Eric A Pierce	亚裔美国人
c.199G>T	p.Val67Phe	Rui Chen	俄罗斯
c.205A>G	p.Met69Val	Jean-Michel Rozet, Eric A Pierce	西班牙法国混血、美国、南非法国混血
c.215T>A	p.Leu72His	Eric A Pierce	印度
c.255G>A	p.Trp85*	Ming Qi	加拿大
c.293T>G	p.Val98Gly	Ming Qi, Rui Chen, Eric A Pierce	巴西、海地、加勒比
c.319G>C	p.Glu107*	Jean-Michel Rozet	法国
c.362delA	p.Glu121Glufs*20	Jean-Michel Rozet	法国
c.439G>C	p.Ala147Pro	Jean-Michel Rozet	法国
c.439+1G>C	Splice	Jean-Michel Rozet	法国
c.451G>T	p.Val151Phe	Ming Qi, Rui Chen	加拿大、欧洲
c.457C>G	p.Leu153Val	Ming Qi	加拿大
c.466G>C	p.Gly156Arg	Eric A Pierce	英国
c.468T>C	p.Leu153Pro	Jean-Michel Rozet	法国
c.507G>A	p.Trp 169*	Ming Qi, Rui Chen, Jean-Michel Rozet	美国、阿尔及利亚、巴西、澳大利亚、爱尔兰
c.518A>G	p.Asp173Gly	Jean-Michel Rozet	法国
c.532G>A	p.Val178Met	Jean-Michel Rozet	法国
c.542A>G	p.Tyr181Cys	Jean-Michel Rozet	法国
c.552A>G	p.Ile184Met	Eric A Pierce	英国
c.565delG	p.Ala189Leufs*25	Eric A Pierce	印度
c.619C>T	p.Arg207Trp	Rui Chen, Jean-Michel Rozet	法裔加拿大、法国
c.643G>T	p.Glu215*	Jean-Michel Rozet	法国
c.650T>A	p.Ile217Asn	Jean-Michel Rozet	南非法国混血
c.709C>T	p.Arg237Cys	Jean-Michel Rozet, Eric A Pierce	法国、美国、印度
c.710G>T	p.Arg237Leu	Rui Chen	爱尔兰
c.716T>C	p.Leu239Ser	Jean-Michel Rozet	法国
c.723delA	p.Pro241Profs*45	Eric A Pierce	加勒比爱尔兰混血
c.752A>C	p.His251Pro	Jean-Michel Rozet	西班牙
c.769G>A	p.Glu257Lys	Ming Qi, Rui Chen, Jean-Michel Rozet, Eric A Pierce	美国、加拿大、巴西、澳大利亚、法裔加拿大、俄罗斯、欧洲、沙特阿拉伯、波兰、加勒比、法国、西班牙、意大利、葡萄牙
c.817A>G	p.Asn273Asp	Ming Qi, Rui Chen	加拿大、法裔加拿大

a) Ming Qi 实验组 11 名患者、Jean-Michel Rozet 实验组 22 名患者中的 17 名、Eric A Pierce 实验组 14 名患者中 6 名及 Rui Chen 实验组 7 名患者中 5 名均带有 c.769G>A 这一突变

4.2 4 个研究组样本来源和发现突变类型的差异

Qi 实验组的样本主要来自于美国、巴西、加拿大和澳大利亚，研究发现的 8 种突变中有 2 个为无义突变，6 个为错义突变；Chen 实验组研究的样本则来

自于加拿大、欧洲、沙特阿拉伯、巴基斯坦、海地、俄罗斯和爱尔兰，共发现了 8 种错义突变和 1 种无义突变；Rozet 实验组的样本来自法国、意大利和西班牙，发现了 14 个错义突变、3 个无义突变、1 个缺失

造成的移码突变和一个剪切位点突变; 而 Pierce 实验组的研究对象则包含美国、巴基斯坦、印度和欧洲等不同国籍的患者, 发现的突变包含 13 个错义突变和 2 个缺失造成的移码突变. 虽然 4 个实验组研究对象有很大区别, 但是 4 个实验组都发现了 c.769G>A 这一突变. 并且全部研究对象中有超过半数的患者带有此突变, 暗示这一突变可能在 LCA 中有着特殊意义.

4.3 4 个研究组蛋白质功能分析结果的差异

人类 NMNAT1 蛋白是一个六聚体, 每一个亚基都由一个中心的 6 链平行片层和两侧的数个螺旋构成^[6]. 仔细分析改变的氨基酸在 NMNAT1 蛋白晶体结构上的位置, 可以预测出突变对蛋白质结构和功能的影响^[15].

Qi 实验组的 11 个病人样本都携带有 p.Glu257Lys 这一突变, 研究人员根据人类 NMNAT1 蛋白的晶体结构进行分析, 认为谷氨酸 257 位于分子的外表面, 并带有一个羧端螺旋. 尤其是邻近的残基——丝氨酸 256, 预测是一个磷酸化作用位点, 并且可能和其他相关蛋白质有物理交互作用, 如 ADP-核糖聚合酶或者蛋白激酶. 用正电荷的赖氨酸残基取代负电荷的谷氨酸残基可能会改变表面的静电性质, 从而影响物理交互作用^[6]. Chen 实验组同样认为精氨酸 207 和谷氨酸 257 这 2 个带电氨基酸位于蛋白质互作区域, 在六聚体的酶中发挥着重要作用. 用一个疏水的色氨酸替换带负电荷的精氨酸 207, 或者用一个带正电荷的赖氨酸替换带负电荷的谷氨酸 257 很可能会直接影响六聚体的形成^[15]. 但与前 2 个研究组的推论不同, Rozet 实验组认为谷氨酸 257 位于蛋白质的溶剂可接触表面, 由正电荷的赖氨酸代替负电荷的谷氨酸可能是耐受的. 再考虑到 c.769G>A 这一突变出现的频率明显高于其他突变, 他们认为这一突变可能是未知突变的连锁不平衡, 而不是致病突变^[16].

天冬氨酸 273 位于短螺旋的最后(残基 267~274), 并且和水分子活性位点的协调相关. Qi 实验组认为用一个酸性氨基酸残基(天冬氨酸)代替这个残基很有可能会影响酶的活力^[6]. 同样, Chen 实验组也得出了类似的结论, 他们认为天冬氨酸 273 残基所处位置很接近嘧啶结合位点并且和水分子活性位点的协调及片层连接相关. 因此, 这些错义突变很可能是影响了 NMNAT1 蛋白的功能, 而不是降低了 NMNAT1

蛋白的表达量^[15].

甲硫氨酸 35 和缬氨酸 151 位于这个蛋白质的疏水核心, 缬氨酸 98 和亮氨酸 153 则非常接近配体结合位点(大约 5~6 Å 的距离). Qi 实验组认为这 4 个突变(p.Met35Thr, p.Val98Gly, p.Val151Phe 和 p.Leu153Val)很有可能会妨碍局部交互作用, 因而改变活性位点, 从而影响酶的活性^[6].

除去 c.769G>A 这一突变, Rozet 实验组还推测出在 147 的位置上用一个脯氨酸代替丙氨酸可能会通过降低蛋白质核定位信号而影响蛋白质天然构相的稳定性; p.Ala13Thr, p.Leu153Pro, p.Asp173Gly 和 p.Val178Met 这 4 个突变会降低蛋白质的催化活性; p.Arg207Trp, p.Ile217Asn, p.Arg237Cys 和 p.Leu239Ser 会影响酶六聚体的形成; 而 p.Met69Val, p.Tyr181Cys 和 p.His251Pro 则会影响蛋白质的疏水作用或稳定性^[16].

与其他实验组不同, Pierce 实验组仅选取了 p.Val9Met, p.Arg66Trp 和 p.Arg237Cys 进行分析, 这 3 个突变位于 NMNAT1 蛋白的保守区域, 利用多种预测软件分析推测这 3 个突变会损害 NMNAT1 蛋白的结构和稳定性. 重组质粒转染多种细胞证实这 3 种突变都有正常核定位和表达水平. 此外, 在体外培养的 LCA 患者成纤维细胞中 p.Val9Met 突变蛋白也显示出正常的核定位. 因此, 研究人员推测这 3 个突变可能会影响蛋白质的功能. 随后的实验证实, p.Val9Met 和 p.Arg66Trp 突变蛋白合成 NAD⁺ 的活性有显著降低. 而 p.Arg237Cys 突变蛋白合成 NAD⁺ 的活性仅有小幅度降低, 鉴于氨基酸 234~238 与蛋白质的相互作用相关, 因此研究人员推测 p.Arg237Cys 突变可能会影响 NMNAT1 蛋白的多聚化^[17], 这一结论与 Rozet 实验组的研究结果相吻合.

4.4 功能分析的结果差异

Chen 研究组对突变的 NMNAT1 基因进行了一系列的功能分析. 首先, 实验人员抽取了患者的血红细胞, 利用比色法检测细胞中 NAD⁺ 的含量, 证实患者血红细胞中 NAD⁺ 含量有明显下降. 同时, 从患者体内使用亲和层析方法纯化的突变 NMNAT1 蛋白在体外实验中也表现出了明显的 NAD⁺ 合成活性降低, 印证了活体检测的结果. 随后, 研究人员利用从胎盘中提取的 RNA 分别构建了携带有突变 NMNAT1 基因和野生型 NMNAT1 基因 cDNA 序列的重组质粒, 并对

实验用增殖表皮癌细胞(Hela 细胞)进行转染. 免疫荧光检测的结果表明, 野生型的 NMNAT1 蛋白主要集中于细胞核中, 而突变型的 NMNAT1 蛋白主要存在于细胞质中^[15].

Pierce 实验组同样对 5 个不同 NMNAT1 基因突变位点进行了相应的功能分析, 包括蛋白质印迹检测、免疫荧光检测、细胞培养和转染、酶活性检测和高效液相色谱分析等. 高效液相色谱法检测 NMNAT1 蛋白合成 NAD⁺活性的结果与 Chen 实验组的研究结果一致, 突变 NMNAT1 蛋白合成 NAD⁺的活性出现了明显的下降, 说明 NMNAT1 基因的突变主要影响 NMNAT1 蛋白的活性而不是表达量. 其他分析同样显示出选取的 5 种 NMNAT1 突变在细胞中都有着正常的表达量和分子质量. 并且 5 种突变蛋白经过亲和纯化, 利用 SDS-PAGE 检测时除 p.Arg66Trp 外都显示出明显条带, 而 p.Arg66Trp 未显示条带的原因还需要进一步实验进行分析. 但是 Pierce 实验组免疫荧光检测的结果却和 Chen 实验组完全不同, 病人的成纤维细胞和经过 NMNAT1 重组质粒转染的 CHO 细胞都显示出正确的细胞核定位^[17], 没有发现异常.

这 2 个实验组结果的差异可能是由于 2 个课题组选取的突变位点和细胞类型不同有关, 具体的机制, 还有待进一步研究.

4.5 其他研究成果

Chen 实验组以自身的研究结果为基础, 设计了一个扩增受阻突变系统引物. 这一引物可以利用简单的 PCR 反应检测 NMNAT1 的突变^[15], 以方便对新生儿进行筛查, 对 LCA 的早期诊断有着很大的意义.

5 展望

本次发表在 *Nat Genet* 上的 4 篇文章证实了 NMNAT1 基因突变可以导致第 9 型 LCA, 这一发现补充了 LCA 分子机制研究的不足, 解释了一些以前无法检测到突变的 LCA 病例. 并且, 对 NMNAT1 进行的一系列初步功能分析揭示了部分 NMNAT1 突变引发 LCA 的原因, 为之后 LCA 的基因治疗和临床诊断奠定了理论基础, 也为进一步的研究指明了方向. 但是, NMNAT1 基因突变并不能解释全部无法检测到已知突变的 LCA 病例, 说明了还有未被发现的 LCA 致病基因. 并且作为一种在人体广泛表达的基因, NMNAT1 对各个组织都有重要的作用, NMNAT1 突变对人体其他组织可能产生的影响, 以及不同突变可能引发的不同症状等一系列问题还有待进一步的探索和研究.

参考文献

- 1 Koenekoop R K. An overview of Leber congenital amaurosis: A model to understand human retinal development. *Surv Ophthalmol*, 2004, 49: 379-398
- 2 Perrault I, Rozet J M, Gerber S, et al. Leber congenital amaurosis. *Mol Genet Metab*, 1999, 68: 200-208
- 3 王攀峰. 四种眼球形态或结构异常及其分子遗传学研究. 博士学位论文. 广州: 中山大学, 2007
- 4 李文生, 郑钦象, 孔繁圣, 等. 遗传学视网膜疾病的基因研究进展. *中华眼科杂志*, 2010, 2: 186-192
- 5 徐玉乐, 李光辉. Leber 先天性黑朦致病基因研究及基因治疗进展. *中华眼底病杂志*, 2011, 5: 499-502
- 6 Chiang P W, Wang J, Chen Y, et al. Exome sequencing identifies NMNAT1 mutations as a cause of Leber congenital amaurosis. *Nat Genet*, 2012, 44: 972-974
- 7 Cremers F P, van den Hurk J A, den Hollander A I. Molecular genetics of Leber congenital amaurosis. *Hum Mol Genet*, 2002, 11: 1169-1176
- 8 den Hollander A I, Roepman R, Koenekoop R K, et al. Leber congenital amaurosis: Genes, proteins and disease mechanisms. *Prog Retin Eye Res*, 2008, 27: 391-419
- 9 Cideciyan A V. Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations and its treatment with gene therapy. *Prog Retin Eye Res*, 2010, 29: 398-427
- 10 单海东, 赵培泉. Leber 先天性黑蒙基因研究进展. *国外医学(眼科学分册)*, 2005, 2: 113-116
- 11 Chung D C, Traboulsi E I. Leber congenital amaurosis: Clinical correlations with genotypes, gene therapy trials update, and future directions. *J AAPOS*, 2009, 13: 587-592
- 12 Maguire A M, High K A, Auricchio A, et al. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: A phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*, 2009, 374: 1597-1605

- 13 Simonelli F, Maguire A M, Testa F, et al. Gene therapy for Leber's congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration. *Mol Ther*, 2009, 18: 643–650
 - 14 Fainzilber M, Twiss J L. Tracking in the Wlds—the hunting of the SIRT and the luring of the Draper. *Neuron*, 2006, 50: 819–821
 - 15 Koenekoop R K, Wang H, Majewski J, et al. Mutations in *NMNAT1* cause Leber congenital amaurosis and identify a new disease pathway for retinal degeneration. *Nat Genet*, 2012, 44: 1035–1039
 - 16 Perrault I, Hanein S, Zanlonghi X, et al. Mutations in *NMNAT1* cause Leber congenital amaurosis with early-onset severe macular and optic atrophy. *Nat Genet*, 2012, 44: 975–977
 - 17 Falk M J, Zhang Q, Nakamaru-Ogiso E, et al. *NMNAT1* mutations cause Leber congenital amaurosis. *Nat Genet*, 2012, 44: 1040–1045
-

Research progress and prospects in molecular mechanisms of Leber congenital amaurosis

WEI TianYing¹ & QI Ming^{1,2,3}

¹*School of Basic Medical Sciences, Department of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;*

²*First Affiliated Hospital and James Watson Institute of Genome Sciences, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China;*

³*Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Rochester, Rochester 14642, USA*

Leber congenital amaurosis (LCA) is the most severe form of inherited retinal dystrophy, and appears in the first year of life, accompanied by diabetes, obesity, and diabetes insipidus. However, there is no effective treatment for LCA. Seventeen genes involved in LCA have been identified, but these can only account for disease in approximately 70% of LCA patients. Most recently, several studies have shown that the *NMNAT1* gene is also associated with LCA. This finding not only explains the genetic mechanism of some LCA cases, but also provides a theoretical basis for the diagnosis and gene therapy of LCA.

Leber congenital amaurosis, *NMNAT1*, gene therapy

doi: 10.1360/972013-54