

· 专论与综述 ·

X 性连锁视网膜色素变性中的 RPGR 基因的研究进展 *

朱 静 张晓莉 府伟灵

(第三军医大学西南医院检验科 重庆 400038)

摘要:视网膜色素变性是一组常见的遗传性致盲眼病,患病率约为 1/3500。X 染色体连锁遗传 RP 作为其中的一种类型,具有发病早,损害最为严重等特点。而在 XLRP 的相关基因中 RPGR 有着重要的意义。本文就 RPGR 的定位克隆、结构、功能及其突变谱予以综述,并对该基因的突变研究的临床意义作出了相关阐述。

关键词:视网膜色素变性;X 连锁 RP;RPGR;ORF15

中图分类号:R774.13 **文献标识码:**A

Advances on research of RPGR in X-linked Retinitis Pigmentosa*

ZHU Jing, ZHANG Xiao-li, FU Wei-ling

(Department of Laboratory Medicine, Southwest Hospital, Chongqing 400038, China)

ABSTRACT: Retinitis pigmentosa (RP) is a common genetic eye disease affecting about 1 in 3500 people the worldwide. X-linked retinitis pigmentosa is the most devastating form of RP because of its severe clinical manifestations. It results from the gene mutations on the X chromosome. The major XLRP gene has been isolated in Xp21.1, retinitis pigmentosa GTPase-regulator (RPGR). This paper overviews the recent advances on the positional cloning, formation, function, and mutation spectrum of RPGR and demonstrates the clinical meanings of this RPGR gene mutation research.

Key Words: Retinitis pigmentosa; XLRP; RPGR; ORF15

视网膜色素变性(Retinitis pigmentosa, RP)是一种常见的遗传性致盲眼病。它是由于光感受细胞的变性而导致的细胞正常功能的缺失所引起的^[1]。它的主要临床特征是:早期出现夜盲、进行性视野缩小、视网膜骨细胞状色素沉着、视盘呈蜡黄色萎缩和视网膜电图(Electroretinogram, ERG)记录异常等。RP有多种遗传方式,大多数为单基因遗传,包括常染色体显性遗传 RP(Autosomal dominant retinitis pigmentosa, ADRP)、常染色体隐性遗传 RP (Autosomal recessive retinitis pigmentosa, ARRP)、X 染色体连锁遗传 RP (X-linked retinitis pigmentosa, XLRP)及线粒体连锁遗传 RP。少数遗传方式则较为复杂,如双基因遗传及不完全显性遗传。若无家族史,则称为散发性 RP。RP 在大多数种族中的患病率约为 1/3500^[1],其中 XLRP 在人群中发病率为 1:25000,占整个视网膜色素变性的 1%~25%,在我国约 7.7%^[2]。虽然如此,但 XLRP 发病早,损害最为严重,是青少年致盲的常见原因之一。近年来随着分子生物学和分子遗传学的发展以及人类基因组全序列测定的重大突破,大大加快了对 XLRP 相关基因的定位以及新突变的发现的步伐,本文主要针对在 XLRP 中具有重要意义的 RPGR 基因的研究进展作相关综述。

1 RPGR 的基因定位克隆

1983 年 Pearson 首先从胎盘染色体 DNA 中分离出 X 性

染色体探针 L1.28 (DXS7), Bhattacharya 等^[3](1984)用限制性内切酶 *Taq I* 进行酶切,用标记 L1.28 探针进行 DNA 杂交,应用 Lods 优势对数值统计分析法对 24 个 XLRP 家族的成员进行了连锁分析,基因定位结果发现 RP 致病相关基因与 L1.28 紧密连锁,两者相距约 0cM~15cM。接着, Mukai 等^[4](1985)通过实验综合其他作者的报道,将两者距离进一步缩短到 5cM。

与之矛盾的是 1985 年, Francke 等^[5]将 RP 相关致病基因定位在 Xp 21 区内,远离 DXS7。经 Wright^[6](1986)进一步验证,通过 RFLP 连锁分析将 RP 相关致病基因定位在 Xp 11.3 区。这与 Bhattacharya 及 Mukai 等人的结论相矛盾。

对于这两种不同实验结果,接下来进一步的连锁分析^[7,8]证明 X 染色体上存在两个不同的 RP 位点,说明 XLRP 的遗传异质性。1989 年 Chen 等^[9]应用 10 个遗传标记进行 RFLP 的连锁分析,证明 XLRP 存在两个位点,且两个位点无相关性,分别命名为 DXS7 远位点和 DXS7 近位点,至此 XLRP 的遗传异质性得到了认可。1990 年 Ott 等^[10]通过 62 个家系的多位点连锁分析和异质性测试证明了前者的结论,并将 DXS7 近侧位点的 XLRP 位点称为 RP2,而 DXS7 远位点的 XLRP 称为 RP3。他根据连锁分析统计结果指出在 XLRP 家系中, XLRP2 占 20%~40%, XLRP3 占 60%~75%。将 RP2 精确定位到 DXS14-DXZI 之间, RP3 精确定位到距 OTC 远端 1cM 处。Roux 等^[11]在 1994 年将 RP3 定位于 Xp21.1 一个更小的区域,最近的侧翼定位标

* 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(No:30400491)

作者简介:朱静(1982-),女,硕士,研究方向:关于 X 性连锁视网膜色素变性的分子遗传学研究

通讯作者:府伟灵, E-mail: weilingfu@yahoo.com

(收稿日期:2006-09-11 接受日期:2006-10-20)

记是 OTC 和 DXS1110。1996 年,Meindl^[14]在一个叫做 RPGR 或视网膜色素变性鸟苷酸酶调节子的基因上找到了 RP 相关突变。此后发现 XLRP 家系多种形式的 RPGR 突变,有无义突变、错义突变、微小缺失、碱基替代造成拼接缺损、碱基插入等。总之 RP3 的定位克隆方法对 XLRP 乃至整个 RP 病人诊断及检出提供有效的手段,并有益于此病的生化及病理机制的研究。

2 RPGR 的结构及功能研究

2.1 关于 XLRP 的相关基因的概述

XLRP 具有遗传异质性,与之有关的致病相关基因已明确有 5 个位点,包括 RP2、RP3、RP6、RP23、RP24,前 4 个定位于 X 染色体的短臂,RP24 位于 X 染色体的长臂。其中 RP2、RP3 基因定位经历较漫长的过程,RP2 (1996 年)、RP3 (1998 年) 基因相继克隆成功。根据遗传统计分析,RP3 约占 XLRP 的 70%~90%^[15]。

2.2 关于 RPGR

RP3 基因又名视网膜色素变性 GTP 酶调节子(Retinitis pigmentosa GTPase regulator, RPGR) 起初被确定含 19 个外显子,编码 815 个氨基酸,其氨基端有 6 个高度保守的串联重复顺序,该串联重复顺序与染色体固缩调控因子(RCC1)有同源性,因此把这段称为 RCC1 相似结构(RCC1-like domain, RLD)。RCC1 是一种鸟苷酸交换因子(Guanine nucleotide exchange factor, GEF) (Ohtsubo et al. 1987; Drivas et al. 1990),可促进 GDP 与 Ras 相关核蛋白(Ras-related nuclear protein, RAN) 解离和 GTP 与 Ran 的结合,因而推测 RPGR 可能与 RCC1 一样是一种新的鸟苷酸交换因子(GEF),起调节相关的 GTP 酶作用,RPGR 蛋白的羧基端是一串酸性氨基酸残基,连有一个异戊二烯位点,这个位点可能是一个 GTP 酶调节因子的膜锚定蛋白结合位点^[16]。研究发现 RLD 与 cGMP PDE δ 亚基相互作用。由于 δ 亚基被认为对催化亚基 α 和 β 的膜整合和胞质化具有调控功能,所以推测 RPGR 突变可能使 cGMP PDE δ 或其他蛋白转运、定位紊乱而导致细胞凋亡。

2.3 关于 ORF15

自最初报告(Meindl et al. 1996, Roepman et al. 1996)的 RPGR 含 19 个外显子以来,好几个研究小组已经在该基因上相继发现了多个新的外显子和多种不同的转录产物(至少 14 个)(Yan et al.^[16]1998, Kirschner et al.^[17]1999, Vervoort et al.^[18]2000, Kirschner et al.^[19]2001)。其中由 Vervoort^[18]等所确认的一 3' 末端外显子紧临近原内含子 14, 序列范围囊括了原外显子 15 和部分内含子 15 的区域,因而命名为 ORF15。该外显子全长 1.6Kb, 序列具有高度重复性,推测可能编码一富含谷氨酸和甘氨酸的结构域。外显子 ORF15 区域是一个突变热点区,在英国人群中报道 47 例 XLRP 患者中在 ORF15 区域有突变的接近于 80%^[20]。RPGR 基因具有多种不同的剪接方式,可产生不同的转录产物。在欧洲人群中进行的突变研究发现,该基因的致病突变均位于其中一个剪接产物——转录子 ORF15(包括原外显子 1-14 和 3' 末端外显子 ORF15)中,表明该转录子在 RP 发病机制及视网膜正常功能维持中可能起着重要的作用。

3 RPGR 基因的突变谱

3.1 外显子 1-19 的突变筛选

近年来,对 RPGR 基因突变的研究表明绝大部分 XLRP 突变是在单个家系中发现,说明该基因上的突变缺乏奠基者效应,而新生突变的频率较高。1997 年 Fujita 等^[21]基于单倍型的数据也得出了这个结论。2003 年 DrorSharon 等^[22]通过对 187 名病人的突变筛查发现了 80 个 RPGR 突变,其中有 41 个是新突变,有 53 个突变位于 ORF15。他们在 135 名临床诊断为 XLRP 的患者中发现有 72.6% 的患者携带 RPGR 突变,在该研究中突变分四种归类:移码突变(共 50 个其中 1-14 号外显子有 10 个, ORF15 有 40 个);无义突变(6 个);剪接位点的突变(5 个);错义突变(9 个)。同年 Ingrtd Bader 等^[23]在对 58 例有明确的 XLRP 诊断的病人作出研究后表明 71% 在 RPGR 有突变。在外显子 2, 5, 6, 10, 15 都发现了突变而在 16, 17, 18 和 19 号外显子却未发现突变。发生的移码突变以 2-, 1- 和 4-bp 的微小缺失引起为主。1-bp 的微小插入和 22bp 的巨大插入都较少见。

3.2 外显子 ORF15 中的突变筛选

在英国 Vervoort 等^[18]于 2000 年对囊括了 RPGR 的整个区域进行了测序,发现 60% 的 XLRP 患者在 3' 端外显子 ORF15 处存在突变,据此推断 RPGR 的突变占 XLRP 患者的 70% 以上,并认为终末外显子 ORF15 处的突变是一个突变热点。接下来在其他种族人群中的研究也发现 ORF15 中存在较高的突变率[Miano et al., 2001; Rabe et al., 2001; Mears et al., 2000; Aguirre et al., 2001; Nao-I et al., 2001]。最近在德国的研究发现在 XLRP 的患者中 RPGR 的突变占 71%, ORF15 突变为 63%^[20],由此看出, ORF15 已成为 XLRP 的一个突变热点^[18, 20]。

近年来,很多学者都针对 RPGR 的基因型和表型进行了研究,早在 2000 年, Sharon 等^[23]就报道过携带 RP2 突变的病人平均都在视野和 ERG 波幅上大于携带 RPGR 突变的病人,而视敏度低于携带 RPGR 突变的病人。在此研究中并未把携带 ORF15 突变的病人纳入比较,这在后来的研究中^[24]得到了补充。后者的报告得出携带 RP2 突变的病人与含 ORF15 突变在内的 RPGR 突变病人相比较,只在视敏度上前者明显低于后者,在视野和 ERG 波幅上都无明显差异,而当将携带 ORF15 突变的病人排除开来再作比较结果发现与 2000 年的报道相符。可见,由于 ORF15 突变所致的 XLRP 在临床症状上表现较轻于 RPGR 的其他突变。

3.3 对中国人 RPGR 基因突变的研究

目前有关 XLRP 的分子遗传学研究仍主要集中在白种人群,亚洲人群报道则主要来自于日本,而有关中国人 XLRP 相关基因突变的系统研究还未见报道,只有一些零散家系的个案报道。

有两个新突变在中国家系中发现^[25],他们是在外显子 9 上的 E332X (G1053T)和在外显子 12 上的 c1536delC,两个突变都出现了与 RP 疾病共分离的现象。还有一个已在中国发现的突变是在第 7 号外显子上的一段 28bp 的缺失^[25]。2005 年 LiYang^[26]等又在中国一个 XLRP 家系中发现了一个在 ORF15 + 483-484 段的 GA 两个碱基对的缺失引起的移码突变。

4 展望

随着分子生物学技术、分子遗传学技术以及基因组测序技术的发展,我们对 RPGR 的认识已是越来越深入。虽然 RP3 位点与 XLRP 疾病的连锁关系早在 1984 年就被 Bhattacharya 等首次确认了,但是直到 2000 年才被 Vervoort 等确定了 RPGR 的突变范围。尤其是近期发现的突变热点 ORF15 更是掀起了研究 RPGR 基因突变的高潮。

通过对 RPGR 的基因分析可以帮助我们更好地了解 RP 基因的生理功能,尤其是在现在基因组学、蛋白组学及生物信息学飞速发展的基础上,我们有望通过蛋白质的同源序列比较发现诸如 RLD 的更多有价值的功能域,为最终阐明 XLRP 的致病机制打下基础。

在对突变基因的定位及克隆以及对突变谱的逐步扩增的基础上我们期望从临床上真正让患者受益。最终能快速准确地借助基因诊断从分子水平明确病因,通过基因治疗从而达到真正的对症治疗。但 ORF15 段富含嘌呤且高度重复,对它进行突变筛选并不容易,加之 RPGR 上新生突变的频率很高,因此为一些新确认的 XLRP 家系提供诊断性的突变筛选就变得较为困难。有关学者提出的临床表型的多态性是否也源于某些突变可能会产生毒性蛋白还有待进一步观察。

参考文献

- [1] Rivolta C, Sharon D, DeAngelis MM, et al. Retinitis pigmentosa and allied diseases: numerous diseases, genes, and inheritance patterns[J]. Hum Mol Genet, 2002, 11: 1219-1227
- [2] 崔云. X 性连锁视网膜色素变性遗传学研究进展[J]. 国外医学遗传学分册, 2001, 24 (1): 42-45
- [3] Bhattacharya SS, Wright AF, Clayton JF, et al. Close genetic linkage between X-linked retinitis pigmentosa and a restriction fragment length polymorphism identified by recombinant DNA probe L1.28[J]. Nature, 1984, 309: 253-255
- [4] Mukai S, Dryja TP, Bruns GA, et al. Linkage between the X-linked retinitis pigmentosa locus and the L1.28 locus [J]. Am J Ophthalmol, 1984, 100: 225-229
- [5] Francke V, Ochs HD, deMartinville B, et al. Minor Xp21 chromosome deletion in a male associated with expression of Duchenne muscular dystrophy, chronic granulomatous disease, retinitis pigmentosa, and McLeod syndrome[J]. Am J Hum Genet, 1985, 37(2): 250-267
- [6] Wright AF, Bhattacharya SS, Clayton JF, et al. Linkage relationships between X-linked retinitis pigmentosa and nine short-arm markers: exclusion of the disease locus from Xp21 and localization to between DXS7 and DXS14[J]. Am J Hum Genet, 1987, 41(4): 635-644
- [7] Clayton JF, Wright AF, Jay M, et al. Genetic linkage between X-linked retinitis pigmentosa and DNA probe DXS7 (L1.28): further linkage data, heterogeneity testing, and risk estimation [J]. Hum Genet, 1986, 74: 168-171
- [8] Curtis Diana, Black CE. Recombination between DXS7, DXS84 and a rare form of X-linked retinitis pigmentosa (McK-30320)[J]. Hum Genet, 1989, 81: 200-202
- [9] Musarella MA, Burghes A, Anson-Cartwright L, et al. Localization of the gene for X-linked recessive type of retinitis pigmentosa (XLRP) to Xp21 by linkage analysis[J]. Am J Hum Genet, 1988, 43: 484-494
- [10] Denton MJ, Chen JD, Serravallo S, et al. Analysis of linkage relation-

ships of X-linked retinitis pigmentosa with the following Xp loci: L1.28, OTC, 754, XJ-1.1, pERT87 and C7 [J]. Hum Genet, 1988, 78: 60-64

- [11] Chen JD, Halliday F, Keith G, et al. Linkage heterogeneity between X-linked retinitis pigmentosa and a map of 10 RFLP loci [J]. Am J Hum Genet, 1989, 45: 401-411
- [12] Ott J, Bhattacharya S, Chen JD, et al. Localizing multiple X chromosome-linked retinitis pigmentosa loci using multilocus homogeneity tests[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 701-704
- [13] Roux AF, Rommens J, McDowell C, et al. Identification of a gene from Xp21 with similarity to the tctex-1 gene of the murine complex [J]. Hum Mol Genet, 1994, 3: 257-263
- [14] Meindl A, Dry K, Herrmann K, et al. Agene (RPGR) with homology to the RCC1 guanine nucleotide exchange factor is mutated in X-linked retinitis pigmentosa (RP3)[J]. Nat Genet, 1996, 13: 35-42
- [15] Vervoort R, Wright AF. Mutations of RPGR in X-linked retinitis pigmentosa (RP3)[J]. Hum Mutat, 2002, 19: 486-500
- [16] Yan D, Swain PK, Breuer D, et al. Biochemical characterization and subcellular localization of the mouse retinitis pigmentosa GTPase regulator (mRpr)[J]. J Biol Chem, 1998, 273: 19656-19663
- [17] Kirschner R, Rosenberg T, Schultz-Heienbrock R, et al. 1999. RPGR transcription studies in mouse and human tissues reveal a retina-specific isoform that is disrupted in a patient with X-linked retinitis pigmentosa[J]. Hum Mol Genet, 1999, 8: 1571-1578
- [18] Vervoort R, Lennon A, Wright AF, et al. Mutation hot spot within a new RPGR exon in X-linked retinitis pigmentosa (RP3)[J]. Nat Genet, 2000, 25(5): 462-466
- [19] Kirschner R, Erturk D, Zeitl C, et al. DNA sequence comparison of human and mouse retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR) identifies tissue-specific exons and putative regulatory elements [J]. Hum-Genet, 2001, 109(3): 271-278
- [20] Bader I, Brandau O, Achatz H, et al. X-Linked retinitis pigmentosa: RPGR mutations in most families with definite X linkage and clustering of mutations in a short sequence stretch of exon ORF15 [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(4): 1458-1463
- [21] Fujita R, Buraczynska M, Gieser L, et al. Analysis of the RPGR gene in 11 pedigrees with the retinitis pigmentosa type 3 genotype: paucity of mutations in the coding region but splice defects in two families[J]. Am J Hum Genet, 1997, 61(3): 571-580
- [22] Dror Sharon, Michael A, Sandberg, et al. RP2 and RPGR Mutations and Clinical Correlations in Patients with X-Linked Retinitis Pigmentosa[J]. Am J Hum Genet, 2003, 73: 1131-1146
- [23] Sharon D, Bruns GA, McGee TL, et al. X-linked retinitis pigmentosa: mutations spectrum of the RPGR and RP2 genes and correlation with visual function[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41: 2712-2721
- [24] Liu L, Jin L, Liu M, et al. Identification of two novel mutations (E332X and c153delC) in the RPGR gene in two Chinese families with X-linked retinitis pigmentosa[J]. Hum Mutat, 2000, 15: 584
- [25] Zhao K, Wang L, Wang L, et al. Novel deletion of the RPGR gene in a Chinese family with X-linked retinitis pigmentosa [J]. Ophthalmic Genet, 2001, 22: 187-194
- [26] Li Yang, Dong Bing, HU Ai-lian, et al. A novel RPGR gene mutation in a Chinese family with X2linked dominant retinitis pigmentosa [J]. Chin J Med Genet, 2005, 22(4): 396-398