

# ДЕТСКАЯ ОФТАЛЬМОЛОГИЯ

УДК: 61.617.741-004.1-053.1

© М.Т. Азнабаев, И.И. Хидиятова, И.М. Хидиятова, С.Р.Авхадеева, Л.У. Джемилева, Э.К. Хуснутдинова, 2014

М.Т. Азнабаев<sup>1</sup>, И.И. Хидиятова<sup>2</sup>, И.М. Хидиятова<sup>2,3</sup>,  
С.Р. Авхадеева<sup>1</sup>, Л.У. Джемилева<sup>2</sup>, Э.К. Хуснутдинова<sup>2,3</sup>

## МУТАЦИИ В ГЕНЕ CRYAA – ОДНА ИЗ ПРИЧИН РАЗВИТИЯ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ВРОЖДЕННОЙ КАТАРАКТЫ

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет»  
Минздрава России, г. Уфа

<sup>2</sup>ФГБУН «Институт биохимии и генетики» Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

<sup>3</sup>ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», г. Уфа

Врожденная катаракта, часто имеющая наследственный характер, является одной из причин слепоты у детей. Наследственная врожденная катаракта (НВК) клинически и генетически гетерогенна. На сегодняшний день идентифицировано 22 гена, мутации в которых ответственны за развитие НВК. Мутации в гене  $\alpha$ -кристаллина А (CRYAA) являются одной из частых причин развития НВК. Методом SSCP-анализа и последующего секвенирования проведен анализ кодирующих последовательностей гена  $\alpha$ -кристаллина А (CRYAA) в 40 неродственных семьях с НВК из Республики Башкортостан (РБ). У двух больных из двух неродственных семей выявлена новая, ранее не описанная мутация с.291C>G (p.His97Gln). У пациентов с данной мутацией наблюдалась изолированная форма врожденной аутомно-доминантной ядерной катаракты. Частота мутации p.His97Gln у больных из РБ составила 5%.

**Ключевые слова:** врожденная наследственная катаракта, ген  $\alpha$ -кристаллина А (CRYAA), мутации.

## M.T. Aznabaev, I.I. Khidiyatova, I.M. Khidiyatova, S.R. Avkhadeeva, L.U. Dzhemileva, E.K. Khusnutdinova CRYAA GENE MUTATION AS ONE OF THE CAUSE OF HEREDITARY CONGENITAL CATARACT

Congenital cataract is a clinically and genetically heterogeneous lens disease responsible for a significant proportion of visual impairment and blindness in childhood. To date, there are 22 genes, mutations in which are responsible for congenital cataract development. Mutations in the  $\alpha$ A-crystallin (CRYAA) gene are one of the most frequent causes of congenital cataract.

The aim of the study was to analyze the CRYAA gene in congenital cataract patients from Bashkortostan Republic. DNA samples of hereditary congenital cataract patients were collected from 40 unrelated families. The analysis was performed by SSCP-analysis followed by sequencing of coding regions of the CRYAA gene. In two patients from two unrelated families we identified one new mutation which hadn't been described previously - c.291C>G (p.His97Gln). Both patients with p.His97Gln mutation demonstrated isolated form of autosomal dominant congenital nuclear cataract. The frequency of this mutation in CRYAA gene among congenital hereditary cataract patients in the investigated region was 5%.

**Key words:** congenital hereditary cataract,  $\alpha$ -crystalline A (CRYAA) gene, mutations.

Катаракта – одно из наиболее частых заболеваний органа зрения, нередко приводящих к слепоте. Частота наследственных врожденных изолированных (несиндромальных) случаев катаракты составляет 1-6 случаев на 10000 детей [1]. Наследственные врожденные катаракты фенотипически и генетически гетерогенны, чаще наследуются по аутомно-доминантному, реже по аутомно-рецессивному и X-сцепленному типам. На сегодняшний день картировано 60 генных локусов, сцепленных с НВК, идентифицировано 22 гена [2]. К частым причинам развития НВК относятся мутации в генах кристаллинов, кодирующих основные белки хрусталика, составляющие до 90% всех его белков. Кристаллины – это высокостабильные водорастворимые белки, обеспечивающие прозрачность хрусталика и его высокий показатель преломления. В хрусталике глаз позвоночных экспрессируются 3 типа кристаллинов:  $\alpha$ -кристаллины (40%),  $\beta$ -кристаллины (35%) и  $\gamma$ -кристаллины (25%).  $\alpha$ -кристаллины являются

членами семейства малых белков теплового шока (sHSP), поэтому они играют важную роль в поддержании прозрачности хрусталика, не только как структурного белка, но и молекулярного шаперона хрусталика, сохраняющего белки в нативном состоянии. В настоящее время известно лишь о 10 различных мутациях в гене CRYAA, обуславливающих развитие различных фенотипических форм катаракты, идентифицированных у больных НВК в некоторых странах Европы и Азии [3]. При этом наблюдается популяционная неоднородность и по частоте наследственных форм катаракты, связанных с мутациями в этом гене, и по спектру самих мутаций.

Поэтому на сегодняшний день актуальными остаются вопросы как о частоте и разнообразии мутаций в гене CRYAA у больных с врожденной катарактой разных регионов мира, так и о связанных с ними фенотипических особенностях и молекулярных механизмах патогенеза заболевания.

Молекулярно-генетические исследования наследственных форм катаракты в Республике Башкортостан (РБ) ранее не проводились. Целью данной работы являлось определение вклада генетических форм наследственной катаракты, связанных с мутациями в гене *CRYAA*, в общую структуру заболевания в исследуемом регионе, а также установление типа наследования и фенотипических особенностей катаракты у пациентов в выявленных мутациями в исследуемом гене.

#### Материал и методы

Исследование проведено в 40 неродственных семьях с врожденной наследственной катарактой из Республики Башкортостан. Диагноз катаракта установлен на основании общепринятого офтальмологического исследования, включающего определение остроты зрения, биомикроскопию, рефрактометрию, офтальмоскопию, кератометрию, эхиоиметрию, тонометрию [4]. Тип наследования катаракты был установлен на основании проведенного генеалогического анализа в семьях больных. У всех обследуемых лиц кровь для ДНК-анализа была получена с их информационного согласия.

Молекулярно-генетическое исследование проведено с использованием стандартных методов: выделение ДНК методом фенольно-хлороформной экстракции из цельной венозной крови [5]; поиск мутаций в кодирующих участках гена *CRYAA* методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК с использованием олигонуклеотидных праймеров, представленных в работе [6], последующим SSCP-анализом и секвенированием образцов с измененной электрофоретической подвижностью одноцепочечной ДНК на автоматическом секвенаторе ABI Prism, модель 3130 XL (Applied Biosystems).

#### Результаты и обсуждение

Ген *CRYAA* локализован в хромосомной области 21q22.3, включает три экзона. В результате нашего исследования у двух неродственных больных с врожденной ядерной катарактой башкирской этнической принадлежности во втором экзоне гена была выявлена замена цитозина на гуанин в 291-м положении нуклеотидной последовательности, приводящая к замене гистидина на глутамин в 97-м положении аминокислотной последовательности белка (с.291C>G (p.His97Gln) (рис. 1).

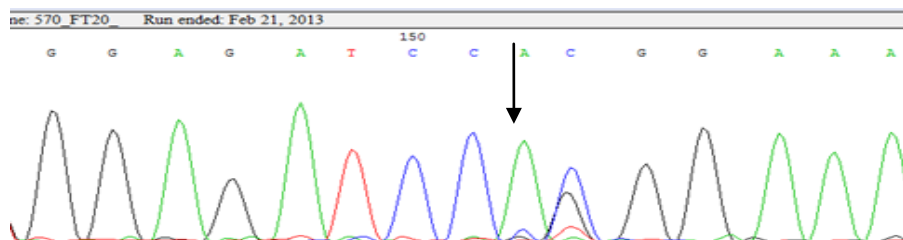


Рис. 1. Секвенирование 2-го экзона гена *CRYAA* у больного НБК с мутацией с.291C>G (p.His97Gln)

Данная нуклеотидная замена ранее не была описана в литературе, но известна мутация в соседнем, 98-м кодоне белка – p.Gly98Arg, обнаруженная в индийской семье с аутосомно-доминантной ядерной катарактой [7]. Обе эти мутации входят в состав высококонсервативного  $\alpha$ -кристаллинового домена белка, определяющего его шаперонную функцию, обеспечивающую защиту хрусталика от некорректной агрегации присутствующих в нем различных белков [8]. Учитывая, что гистидин – это полярная, положительно заряженная гетероциклическая аминокислота, а глутамин – полярная незаряженная алифатическая аминокислота, можно предположить, что такая аминокислотная замена может приводить к изменению структуры и к нарушению функциональных свойств белка. Кроме того, мутация p.His97Gln была обнаружена нами только у пробандов с наследственной врожденной катарактой и не была выявлена у здоровых членов семей. Исходя из этих пред-

положений мы предполагаем, что данная мутация может являться причиной развития катаракты в исследованных семьях. Частота мутации с.291C>G (p.His97Gln) среди больных с ВНК из РБ составила 5%.

Согласно литературным данным более 50% наследственных форм катаракты обусловлено мутациями в генах кристаллинов, прежде всего в гене  $\alpha$ A-кристаллина (*CRYAA*) [2]. Кодируемый геном белок  $\alpha$ A-кристаллин, состоящий из 173 аминокислот, содержит N-концевой регион, консервативный  $\alpha$ -кристаллиновый домен и короткий C-концевой регион.  $\alpha$ -кристаллиновый домен может быть вовлечен в агрегацию и дезагрегацию крупных белковых комплексов, тогда как N- и C- концевые домены предположительно участвуют в олигомеризации белков [8,9]. Известные на сегодняшний день мутации локализованы преимущественно в N-концевом и  $\alpha$ -кристаллиновом доменах белка *CRYAA*. Катаракта, обусловленная мутация-

ми в гене *CRYAA*, чаще всего имеет доминантный тип наследования, а ее фенотипы у большинства обследованных больных описаны как соответствующие ядерному или зонулярному типам, часто в сочетании с микрокорнеа, микрофтальмией и/или колобомой радужки [6,9,1011,12,13]. На основе этого было сделано предположение, что помимо хрусталика  $\alpha$ -кристаллин может играть важную роль и в эмбриональном развитии переднего сегмента глаза [9,10]. Дальнейшие исследования в этом направлении представляют значительный интерес, поскольку проблема генетической предрасположенности к микрокорнеа и другим мальформациям глаза, ассоциированным с врожденной катарактой или развивающимися изолированно, до сих пор остается мало изученной. В то же время с клинической точки зрения дифференцирование катаракты с нормальным размером роговицы и катаракты с микрокорнеа достаточно важно, потому что, как уже не раз было показано, врожденная катаракта в сочетании с микрокорнеа является существенным фактором риска для последующего развития глаукомы

[9]. Выявленная нами новая мутация p.His97Gln в гене *CRYAA* пополняет список мутаций, приводящих к развитию врожденной аутосомно-доминантной изолированной катаракты. Для более углубленного исследования функциональной роли данной мутации в патогенезе врожденной катаракты требуются дополнительные исследования.

**Заключение.** Таким образом, у больных РБ с врожденной изолированной катарактой в кодирующей части гена *CRYAA* выявлена новая, ранее не описанная мутация с.291C>G (p.His97Gln), приводящая к развитию врожденной изолированной ядерной катаракты. Частота мутации p.His97Gln в гене *CRYAA* у больных РБ составила 5%. В целом полученные данные вносят вклад в познание патогенеза заболевания, его географии и являются основой для разработки оптимальных для региона подходов к ДНК-диагностике и эффективным методам генетического консультирования семей с наследственными формами врожденной катаракты.

Работа частично финансирована грантом РФФИ №14-04-97007р\_Поволжье\_а.

#### *Сведения об авторах статьи:*

**Азнабаев Марат Талгатович** – д.м.н., академик АН РБ, профессор кафедры офтальмологии с курсом ИПО ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450000 Уфа, ул. Ленина, 3. Тел./факс: (347) 275-97-65.

**Хидиятова Индира Ильдаровна** – аспирант лаборатории молекулярной генетики человека ФГБУН «Институт биохимии и генетики» УНЦ РАН. Адрес: 450054, г. Уфа, проспект Октября, 71. Тел./факс: (347) 235-60-88.

**Хидиятова Ирина Михайловна** – д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт биохимии и генетики» УНЦ РАН, профессор кафедры генетики и фундаментальной медицины ФГБОУ ВПО БГУ. Адрес: 450054, г. Уфа, проспект Октября, 71. Тел./факс: (347) 235-60-88.

**Авхадеева Светлана Рудольфовна** – к.м.н., доцент кафедры офтальмологии с курсом ИПО ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450000 Уфа, ул. Ленина, 3. Тел./факс: (347) 275-97-65.

**Джемилева Лилия Усеиновна** – д.м.н., доцент, старший научный сотрудник ФГБУН «Институт биохимии и генетики» УНЦ РАН. Адрес: 450054, г. Уфа, проспект Октября, 71. Тел./факс: (347) 235-60-88.

**Хуснутдинова Эльза Камилевна** – д.б.н., профессор, академик АН РБ, зав. отделом геномики ФГБУН Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, зав. кафедрой генетики и фундаментальной медицины ФГБОУ ВПО БГУ. Адрес: 450054, г. Уфа, проспект Октября, 71. Тел./факс: (347) 235-60-88.

#### **ЛИТЕРАТУРА**

1. The genetics of childhood cataract / P. Francis [et al.] // J. Med. Genet. – 2000. – Vol.37. – P. 481–488.
2. Mutation screening and genotype phenotype correlation of  $\alpha$ -crystallin,  $\gamma$ - and GJA8 gene in congenital cataract / M. Kumar [et al.] // Molecular Vision. – 2011. – Vol.17. – P.693-707.
3. www.hmd.org – 10.01.2014г.
4. Шамшинова, А.М. Функциональные методы исследования в офтальмологии / А.М. Шамшинова, В.В. Волков – М., 1998. – С.133-195, 222-253.
5. Mathew, C. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA. Methods in molecular biology / C. Mathew // Ed. Walker J.M. N.Y. Hama press. – 1984. – Vol.2. – P.31-34.
6. Congenital cataract and macula hypoplasia in humans associated with a de novo mutation in *CRYAA* and compound heterozygous mutations in *P/J. Graw* [et al.] // Graefe's Arch Clin Exp Jphthalmol. – 2006. – Vol.244. – P.912-919.
7. Identification of a novel, putative cataract-causing allele in *CRYAA* (G98R) in an Indian family / S.Santhiya [et al.] // Mol. Vis. – 2006. – Vol.12. – P.768-773.
8. Wistow, G. Domain structure and evolution in alpha-crystallins and small heat-shock proteins / G. Wistow // FEBS Lett. – 1985. – Vol.181. – P.1-6.
9. Genetic heterogeneity in microcornea-ataract: five novel mutations in *CRYAA*, *CRYGD*, and *GJA8* / L.Hansen [et al.] // Invest. Ophthalm. Vis. Sci. – 2007. – Vol.48. – P. 3937-3944.
10. Autosomal dominant congenital cataract associated with a missense mutation in the human alpha crystallin gene *CRYAA* / M. Litt [et al.] // Hum. Molec. Genet. – 1998. – Vol.7. – P. 471-474.
11. Crystallin gene mutations in Indian families with inherited pediatric cataract / R.Devi [et al.] // Mol. Vis. – 2008. – Vol.14. – P.1157–1170.
12. Pathogenic mutations in two families with congenital cataract identified with whole-exome sequencing / Y. Kondo [et al.] // Mol. Vis. – 2013. – Vol.19. – P.384-9.
13. Identification of a novel oligomerization disrupting mutation in *CRYAA* associated with congenital cataract in a South Australian family / K. Laurie [et al.] // Hum. Mut. – 2013. – Vol.34. – P. 435-438.