Изучение генетических основ и разработка протоколов для диагностики наследственных заболеваний органа зрения на примере врожденной аниридии*

Васильева Т.А.[1], Хлебникова О.В.[1], Марахонов А.В.[1,2], Петрова Н.В.[1], Воскресенская А.А.[3], Поздеева Н.А.[3], Крынская И.А.[1], Козлова Ю.О.[1], Ряднинская Н.В.[1], Чухрова А.Л.[1], Шилова Н.В.[1], Зинченко Р.А.[1,4]

[1] — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр»
[2] — Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)»
[3] — Чебоксарский филиал Федерального государственного автономного учреждения «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. академика С.Н. Федорова Министерства здравоохранения Российской Федерации
[4] — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Актуальность. Врожденные пороки развития органа зрения составляют немалую долю причин инвалидизации в детском возрасте. Врожденная аниридия является тяжелым наследственным пороком развития, наследующимся аутосомно-доминантно. Врожденная аниридия вызывается мутациями гена *PAX6*. *Цель.* Оценить спектр генетических нарушений в группе больных врожденной аниридией из российской популяции. На основе полученных результатов разработать протокол диагностики врожденной аниридии. *Материалы и методы.* Тридцати четырем пациентам из 27 неродственных семей проведены офтальмологическое обследование и ДНК диагностика, включающая секвенирование кодирующих экзонов гена *PAX6* с последующим анализом крупных хромосомных перестроек локуса 11p13. *Результаты.* Проанализировано 22 больных без отягощенной семейной истории и 12 семейных случаев врожденной аниридии. У двух пациентов определена протяженная делеция региона 11p13, позволившая установить предположительный диагноз синдрома WAGR. Среди оставшихся пациентов мутации были определены во всех случаях. У 23 пациентов были обнаружены точковые мутации гена *PAX6*: семь новых и восемь различных ранее описанных мутаций. Крупные делеции определены у одиннадцати пациентов. Проанализированный спектр мутаций позволил определить особенности генетических причин врожденной аниридии у российских больных и разработать протокол диагностики врожденной аниридии. *Выводы.* Определены мутации у 100% проанализированных больных. Разработан протокол диагностики врожденной аниридии с учетом особенностей спектра наследственных изменений, приводящих к этому заболеванию, в российской популяции.

Ключевые слова: наследственные заболевания, орган зрения, аниридия, WAGR синдром, тест-система, крупные хромосомные аберрации, вариации числа копий, FISH анализ, потеря гетерозиготности, мутации

Введение

Врожденные пороки развития (ВПР) органа зрения являются одной из основных причин инвалидности в детском возрасте с малой эффективностью лечения. Распространенность этой патологии составляет не менее 2,7 на 10 000 населения. В связи с отсутствием для большинства ВПР органа зрения эффективной хирургической и терапевтической коррекции возрастает роль профилактических мероприятий, направленных на предотвращение появления повторных случаев заболевания в отягощенных семьях. Именно поэтому актуальной представляется разработка протоколов для диагностики ВПР органа зрения.

Разработка таких протоколов связана со значительными трудностями, вызванными разнообразием этиологических причин ВПР глаза. По этиологическому принципу различают три группы пороков: наследственные, экзогенные, многофакторные [1]. Доля моногенных ВПР среди наследственной патологии глаз в различных популяция РФ составляет от 14 до 55% [2]. Одна из частых форм ВПР органа зрения — врожденная аниридия — наследственный моногенный или хромосомный множественный порок развития, затрагивающий

* Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Исследование больных врожденной аниридией частично поддержано грантами РФФИ 14-04-00525 и 15-04-01859. Часть исследований оплачена Благотворительным фондом «Созидание».
Авторы благодарны за неоценимую помощь и инициативу в организации исследования врожденной аниридии в нашей стране Галине Николаевне Генинг — президенту Межрегиональной общественной организации «Межрегиональный центр помощи больным аниридией «Радужка»», всем пациентам и их семьям за их участие, а также Елене Тимошиной — председателю Благотворительного фонда «Созидание» за поддержку в развитии проекта.

в большинстве случаев все структуры глаза, ЦНС (в 10—17% это грубые нарушения и задержка развития), поджелудочную железу (ее эндокринная функция немного снижена, у пациентов нарушена толерантность к глюкозе из-за снижения уровня секретируемого инсулина, иногда развивается сахарный диабет второго типа), гипоталамо-гипофизарную систему, а иногда и другие системы органов (менее 10%) [3, 4]. С 2003 г. в России зарегистрировано около 300 случаев врожденной аниридии (неопубликованные данные ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» и Межрегиональной общественной организации «Межрегиональный центр помощи больным аниридией «Радужка»»). В последние годы предлагается вместо названия нозологической формы «врожденная аниридия» использовать новый термин *PAX6* синдром [5].

Врожденная аниридия в 75% случаев встречается как изолированный порок развития глаза без очевидного визуализированного вовлечения других органов и систем, в 10% ВПР радужки осложнен дополнительными поражениями. В обоих случаях врожденная аниридия обусловлена гетерозиготными мутациями в гене *PAX6*, в том числе хромосомными перестройками, вовлекающими регион 11p13. В 13% случаев аниридия встречается как часть синдрома WAGR [6]. Синдром WAGR обусловлен делецией региона 11p13, захватывающей локусы гена *PAX6* и гена предрасположенности к развитию опухоли Вильмса *WT1*. WAGR встречается, в основном, в виде спорадических случаев. Во всех спорадических случаях врожденной аниридии до установления генетической причины больной аниридией имеет 50%-ный риск развития нефробластомы до 8 лет жизни [7]. Высокий риск и злокачественность карциномы почки, составляющей синдром WAGR, — определяют важность дифференциального диагноза.

В 2—5% случаев аниридия ассоциирована с другими моногенными и хромосомными синдромами, более редкими по частоте [6]. В международной базе данных OMIM выделено 25 различных синдромов. В редких случаях (от 4 до 10%) врожденная аниридия может быть ассоциирована с мутациями в генах *FOXC1* (OMIM*601090), *PITX2* (OMIM*601542), *PITX3* (OMIM*602669) и других [8—10]. При этом в подавляющем большинстве случаев мутации в генах *FOXC1* и *PITX2* ассоциированы с синдром Аксенфельда—Ригера (OMIM #, OMIM #602482) и аномалией Петерса (OMIM #) [11]. Синдром Аксенфельда—Ригера — это различные варианты фенотипов, общей чертой которых является риск развития глаукомы в 50% случаев, вызывается мутациями в генах *PAX6, FOXC1, PITX2* и других. Аномалия Петерса характеризуется центральным бельмом и отсутствием задней части стромы роговицы и десцеметовой мембраны, сращением радужки с задней частью роговицы. Учитывая схожесть фенотипов, приходится проводить дифференциальную диагностику аниридии и с этими пороками развития передней камеры глаза. Аномалии Петерса и Аксенфельда генетически гетерогенны и обычно ассоциированы с мутациями в одном из генов: *PITX2, FOXC1, CYP1B1, PAX6* и другими [12].

Значительную сложность в молекулярном подтверждении диагноза врожденной аниридии представляет гетерогенность молекулярных механизмов повреждения гена *PAX6*. Они включают в себя не только точковые мутации, но и крупные хромосомные перестройки с вовлечением области p13 хромосомы 11. При этом хромосомные перестройки в ряде случаев могут затрагивать не кодирующую часть гена *PAX6*, а дистальный *цис*-регуляторный район, находящийся на расстоянии 150 т.п.н. от гена. Кроме того, как и при других аутосомно-доминантных состояниях, при врожденной аниридии довольно высока частота соматического мозаицизма по патогенной мутации, оцениваемая в 17,5% спорадических случаев [13]. Изучение спектра и частот мутаций в гене *PAX6* в разных популяциях мира показало наличие региональных особенностей [14—16]. Высокая гетерогенность нарушений гена *PAX6* и вариабельность спектра и частот мутаций при врожденной аниридии приводит к необходимости разработки различных методических подходов к диагностике и дифференциальной диагностике заболевания для РФ.

Цель и задачи: изучение спектра мутаций и разработка протокола для диагностики врожденной аниридии на выборке 34 больных из России.

Материалы и методы

От всех обследованных больных или их законных представителей (родителей) получено информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ».

В исследование включены 34 больных с врожденной аниридией из 27 неродственных семей из России. Большинство случаев представлено единичными больными без отягощенного семейного анамнеза (62%). Возраст пациентов варьировал от 6 месяцев до 51 года (средний возраст 15 лет), большинство больных в выборке обследованы в возрасте до 15 лет. Диагноз поставлен на основе клинической картины в ФГБНУ «МГНЦ» (12 больным) и в Чебоксарском филиале ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» (22 больным). Для верификации клинического диагноза использован современный комплекс офтальмологических методов диагностики (клинические, инструментальные и пр.). Проведен анализ результатов обследования пациентов у педиатра и невролога.

Выделение ДНК из периферической крови пациентов проводилось с использованием наборов для выделения «Wizard Genomic DNA Purification Kit» (USA) в соответствии с рекомендациями производителя.

Анализ мутаций в гене *PAX6* включал: двунаправленное прямое секвенирование 14 экзонов гена *PAX6*, муль-

типлексную реакцию лигазозависимой амплификации проб (MLPA) с последующим подтверждающим анализом потери гетерозиготности путем исследования сегрегации STR маркеров в семьях.

Для секвенирования по Сэнгеру были подобраны праймеры к экзонам транскрипционного варианта NM_000280.4 и к экзону 5a (транскрипционный вариант NM_001604.5), расположенному внутри интрона 5 мажорной изоформы. Праймеры использовались для амплификации экзонных и фланкирующих их интронных последовательностей по стандартным протоколам. Продукты секвенировали и анализировали с использованием BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit на анализаторе 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Частота идентифицированных аллелей в мировых популяциях устанавливалась с помощью баз данных: dbSNP (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/), 1000 геномов (http://www.1000genomes.org/), 6500 экзомов (ESP6500, http://evs.gs.washington.edu/EVS/) и ExAC browser (http://exac.broadinstitute.org/).

Возможный функциональный эффект миссенс-вариантов установлен с применением нескольких предсказательных алгоритмов: SIFT, PolyPhen, MutationTaster, MutationAssessor, FATHMM и Radial SVM, а также с применением шкал консерватизма GERP++ и PhyloP.

Интронные варианты и изменения консенсусных последовательностей сайтов сплайсинга проанализированы с помощью алгоритма Human Splicing Finder v. 2.4.1 [17].

Статус патогенности идентифицированных вариантов последовательности установлен на основе использования рекомендаций американского колледжа медицинской генетики и ассоциации молекулярной патологии (American College of Medical Genetics and Genomics, the Association for Molecular Pathology) [18].

MLPA-анализ проведен с использованием SALSA MLPA набора проб P219-B2 PAX6 (MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands) в соответствии с рекомендациями производителя [19]. Результаты MLPA проанализированы с помощью программы Coffalyser.Net (MRC-Holland). Набор MLPA проб P219-B2 покрывает область chr11:27636398-35117389 (NCBI36/hg18) и содержит пробы на каждый экзон гена *PAX6* (кроме 7 и 13), несколько проб на экзоны гена *WT1* и некоторые другие гены: соседние с *PAX6* со стороны теломеры и центромеры хромосомы, а также на ген *SOX2*, расположенный на хромосоме 3.

Для подтверждения протяженных делеций области 11p13, обнаруженных реакцией MLPA, использовали анализ потери гетерозиготности, основанный на семейном анализе сегрегации аллелей сцепленных с делециями маркеров. Высокополиморфные маркеры — короткие тандемные повторы (STR) — выбраны из STR Catalog Viewer [20]. В семьях, где у пробанда обнаружена хромосомная делеция, выполнено генотипирование по 12 STR-маркерам, расположенным в области chr11:30632179-33144526 (NCBI 36/hg18).

Все внутригенные мутации названы в соответствии с транскрипционным вариантом 1 *PAX6* (NM_000280.4). Границы делеций названы в соответствии с положением MLPA-проб с уменьшенным сигналом (и в соответствии со сборкой NCBI 36/hg18).

Для верификации результатов MLPA в случаях выявления микроделеции в коротком плече хромосомы 11 (p13), затрагивающей ген *WT1*, проведена таргетная флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH) с локус-специфичным ДНК-зондом (LSP WT1). Дизайн ДНК-зонда предусматривает наличие контрольного локуса (центромерный район хромосомы 11), меченного контрастным по окраске флуорохромом, для оценки эффективности гибридизации, на прицентромерный локус, локализованный в регионе 11p (CEN11p (FITC) FISH Probe, FC0096, Abnova). Для проведения FISH использовался набор FA0275 (Abnova, Taiwan).

Материалом для проведения FISH-исследования служили препараты из суспензии фиксированных некультивированных лимфоцитов периферической крови пациентов (интерфазная FISH). В каждом сете гибридизации были проанализированы как препараты пациентов, так и контрольные препараты некультивированных лимфоцитов, полученные от пациентов без делеции *WT1* (case-control). Как в опытных, так и в контрольных образцах было проанализировано не менее 50 интерфазных ядер.

Результаты

Первоначально, с целью исследовать генетическую гетерогенность больных врожденной аниридией, 34 больным из 27 неродственных семей был проведен молекулярно-генетический анализ, включавший полное секвенирование всех кодирующих экзонов гена *PAX6* с последующим MLPA-анализом. 21 больной не имел отягощенного семейного анамнеза, в то время как 13 остальных имели пораженных членов семьи первой и/или второй степени родства.

Прямое двунаправленное секвенирование позволило выявить генетический дефект в 67,6% (23/34) случаев врожденной аниридии. Выявлены 15 разных точковых мутаций, в том числе 7 незарегистрированных генетических вариантов, и 8 известных мутаций [21—28]. Впервые выявлены: пять коротких инсерций и/или делеций (c.291_294dup4(CTTT), c.449_453del5(ACGGG)ins7(CCGGAAC), c.760delA, c.879delC, c.1047_1050del4(CCAG)), одна миссенс-мутация c.19G>C, одна нонсенс-мутация c.511C>T. Кроме того, были идентифицированы ранее описанные мутации: одна мутация сайта сплайсинга (c.-128-2delA), одна миссенс-мутация (c.140A>G), две интронных мутации (c.141+4A>G, c.1032+6T>G), четыре различных нонсенс-мутации (c.307C>T, c.607C>T, c.718C>T,

c.781C>T). Все обнаруженные и подтвержденные мутации зарегистрированы в открытой базе данных о мутациях человека LOVD 3.0 (http://databases.lovd.nl/shared/genes/PAX6). В одной семье у одного из родителей обнаружен соматический мозаицизм (>10%) по мутации c.19G>C, ассоциированный с субтильным поражением радужки. Частая и в других популяциях нонсенс-мутация c.607C>T (p.Arg203*) встретилась у троих неродственных больных из данной выборки. Ни одна из впервые обнаруженных мутаций не встретилась в данных полноэкзомного секвенирования 60 706 неродственных здоровых индивидов из разных популяций Exome Aggregation Consortium (ExAC) [29]. Обнаруженные небольшие внутригенные изменения распределены по всему гену относительно равномерно.

В оставшихся 11 случаях (32,4%) никаких внутригенных мутаций не обнаружено. У этих больных MLPA-анализом выявлены протяженные хромосомные делеции, захватывающие локус гена *PAX6* и/или локусы соседних генов. Полученный в настоящем исследовании на российской выборке больных процент делеций не отличается от данных литературы [14].

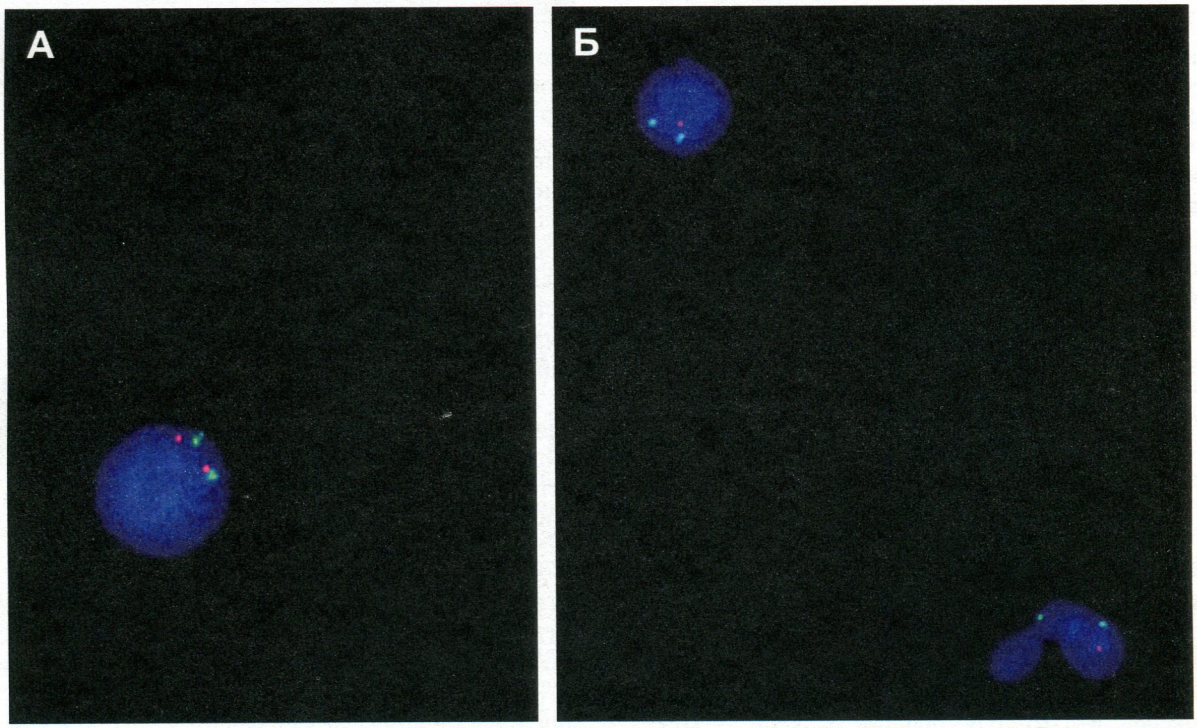
У двоих больных с аниридией обнаружена делеция, по крайней мере, 7500 т.п.н. (A), затрагивающая ген *WT1*. Делеция была верифицирована методом FISH по характерному паттерну гибридизации — единичному сигналу, соответствующему локусу *WT1* (рисунок).

У этих пациентов предположен диагноз *синдром WAGR* с рекомендациями постоянного наблюдения у онкологов до 8 лет.

У остальных 9 пациентов с диагнозом *врожденная аниридия* выявлены делеции размером от 16 до 2200 т.п.н. (таблица; делеции B-G), затрагивающие регион 11p13. В двух случаях обнаружена сходная делеция протяженностью около 446 т.п.н., захватывающая локусы генов *PAX6, ELP4* и *DCDC1* (таблица; делеция D), еще у троих неродственных пробандов определена делеция удаленной 3' *цис*-регуляторной области, расположенной на уровне генов *ELP4* и *DCDC1*. Согласно положению проб, длина делетированного участка в этом случае может варьировать от 500 до 1000 т.п.н. (таблица; делеция C).

Так как результаты MLPA-анализа нуждаются в подтверждении другими методами, был проведен анализ потери гетерозиготности в 6 доступных семьях. Установлены информативные маркеры, проведен анализ потери гетерозиготности у пробандов по этим локусам, который позволил подтвердить обнаруженные делеции, а также в ряде случаев определить происхождение мутантного аллеля. В четырех случаях из шести определена потеря отцовского аллеля.

На основе полученных молекулярных данных был разработан протокол для диагностики врожденной аниридии.



Репрезентативный FISH анализ интерфазных ядер лимфоцитов периферической крови больного 20.03 с делецией «B», затрагивающей гены с FSHB по WT1 del, по сравнению с контрольным образцом. Зонд на ген *WT1* мечен красным красителем, зонд на прицентромерный регион 11p мечен зеленым красителем:
А — FISH анализ контрольного образца; Б — FISH анализ пациента №20.03 (делеция «B»).

1. Детальное офтальмологическое и медико-генетическое обследование пациента и всей его семьи врачами офтальмологом и генетиком с целью постановки первичного клинического диагноза с учетом возможной синдромальной патологии.

2. Подтверждающая молекулярная диагностика, включающая следующие этапы:

• кариотипирование пробандов для исключения синдромальной патологии и грубых хромосомных нарушений.

• проведение анализа копийности генов в локусе 11p13 путем реакции лигазозависимой амплификации зондов (MLPA-анализ).

• при обнаружении крупных делеций, для валидации выполняется генотипирование отягощенных семей по нескольким микросателлитным маркерам хромосомы 11. В случаях обнаружения крупных делеций, затрагивающих ген *WT1*, проводится флуоресцентная *in situ* гибридизация FISH с зондом, специфичным к гену *WT1*, для валидации гемизиготного состояния локуса у пробанда. У таких пациентов предполагается диагноз WAGR-синдрома и даются рекомендации постоянного наблюдения у онколога до 8 лет.

• при отсутствии крупных структурных изменений локуса 11p13 у пробанда, прямым секвенированием по Сэнгеру определяются точковые изменения гена *PAX6*.

• проводится подтверждение патогенности впервые найденных внутригенных мутаций в гене *PAX6* с помощью анализирующих предсказательных программ, данных об отсутствии этого изменения в выборке здоровых людей и/или у здоровых членов семьи.

• определяются мутации у больных членов семьи пробанда, если имеется семейная история. В случае, когда очевидной истории нет, необходимо подтвердить статус мутации *de novo* доказательством отсутствия мутации пробанда у родителей. На этом же этапе проводится анализ возможного соматического мозаицизма у родителей.

• при отсутствии патогенных мутаций в локусе 11p13 возможен дальнейший поиск нарушений в генах *B3GALTL*, *BMP4*, *CYP1B1*, *FOXC1*, *FOXE3*, *OTX2*, *PITX2*, *PITX3*, *SOX2*, *VSX2* (*CHX10*), которые ассоциированы со схожими фенотипами в низком проценте случаев (4%) [30].

Обсуждение

В результате проведенного исследования определен спектр мутаций в гене *PAX6* на выборке российских больных. Обнаружены некоторые характерные для российской популяции особенности. В спектре ясно определилось смещение в сторону крупных делеций и мутаций, приводящих к сдвигу рамки считывания. Часто появляющиеся в других популяциях миссенс-мутации встретились лишь у пяти пациентов, в том числе в двух семейных случаях. Обе мутации в семейных случаях затрагивают парный домен. В обследованной выборке больных аниридией выявлены не встречавшиеся в других популяциях небольшие делеции и инсерции, приводящие к сдвигу открытой рамки считывания и возникновению преждевременного стоп-кодона. Для данной выборки характерно большое количество спорадических случаев аниридии, а среди них — случаев, ассоциированных с геномными делециями. Частота встречаемости делеции удаленной *цис*-регуляторной области, расположенной на уровне генов *ELP4* и *DCDC1* (примерно 200 т.п.н. от гена *PAX6*) и оставляющей интактной кодирующую область самого гена *PAX6* (3/34), диктует необходимость включения исследования этого региона в рутинный молекулярно-генетический анализ врожденной аниридии. В одной семье один из родителей имет мозаицизм по мутации, переданной пробанду.

Учитывая обнаруженную гетерогенность и значительный клинический полиморфизм различных нозологических форм, ассоциированных с аниридией, а также высокую вероятность развития опухоли Вильмса (более 50% спорадических случаев), при составлении алгорит-

Таблица

Обнаруженные делеции региона 11p13

Пациент	Обозначение	Геномные координаты в соответствии с hg18	Приблизительная длина	Вовлеченные гены (частичный список)
52.03 07.03 (WAGR)	A	27 636 398-35 117 389	~7,5 млн п.н.	*BNDF-FSHB-DCDC1-ELP4-PAX6-RCN1-WT1-HIPK3-LMO2-EHF-CD44*
20.03	B	30 210 128-32 413 841	~2,2 млн п.н.	*FSHB-DCDC-ELP4-PAX6-RCN-WT1*
09.03, 02.12, 30.0k	C	30 675 524-31 628 232	~1 млн п.н.	*DCDC1-ELP4 exon9* (кодирующая часть гена *PAX6* не затронута)
04.14 48.03	D	31 347 785-31 794031	~0,4 млн п.н.	*DCDC1exon1-ELP4-PAX6 intron1*
07.17	E	31 628 232-32 413 841	~0,8 млн п.н.	*ELP4exon 9-PAX6-RCN1-WT1 exon 1*
36.03	F	31 778 912-32 208 363	~0,4 млн п.н.	*PAX6 exon9-RCN1*
57.0k	G	31 778 912-31 794 631	~16 т.п.н.	*PAX6 intron 1- PAX6 exon 9*
Координаты *PAX6*: 31,762,916-31,789,477 (hg18)				

ма диагностики аниридии необходимо принимать во внимание ряд особенностей.

При наличии пораженных родителей, делеция генов *WT1* и *PAX6* редко является генетической причиной аниридии (хотя несколько семейных случаев синдрома WAGR зарегистрированы). Если у пациента с аниридией определена WAGR-делеция, у него резко возрастает риск развития опухоли Вильмса. Если область делеции не захватывает ген *WT1*, дальнейшее определение внутригенных мутаций в гене *PAX6* в качестве причин «аниридийного» клинического фенотипа становится менее безотлагательным, хотя и проясняет генетическое консультирование в отягощенных семьях [12]. Высокая частота спорадических крупных делеций региона 11p13, а также необходимость дифференциальной диагностики с синдромом WAGR определяют необходимость проведения MLPA-анализа на первоначальном этапе диагностического алгоритма.

Однако в любом случае обнаруженные крупные делеции необходимо подтверждать альтернативными методами. При обнаружении делеции региона 11p13, захватывающий ген *WT1,* проводится прямое подтверждение синдрома методом локус-специфичной FISH. В остальных случаях разработанная панель микросателлитных локусов позволяет определить потерю у пробанда маркеров одного из родителей, другими словами определить потерю гетерозиготности по локусам микросателлитных повторов, сцепленных с обнаруженной делецией хромосомы 11.

Из-за высокой частоты мутаций *de novo* и встречающегося соматического мозаицизма по патогенной мутации в гене *PAX6* очень важную роль играет внимательное изучение семейной истории, дополнительное клиническое обследование родителей и выяснение их генетического статуса, от которого зависит риск повторного рождения больного ребенка в семье. Если у одного из родителей есть изолированная аниридия (даже с минимальными клиническими проявлениями, в виде дисплазии радужки), риск составляет 50%. Если родители здоровы, с учетом возможного гонадного мозаицизма, риск рассчитывается индивидуально, с учетом родословной и доли мозаичных клеток, он немного выше среднего в популяции.

Идентификация патогенных изменений кодирующей последовательности или делеции локуса гена *PAX6* подтверждает диагноз изолированной аниридии, определение делеции области, захватывающей *PAX6* и *WT1* предполагает диагноз WAGR (для такого больного резко возрастает риск развития опухоли почки).

Выводы

Молекулярный анализ тридцати четырех пациентов с врожденной аниридией позволил определить спектр мутаций в гене *PAX6* и в регионе 11p13 в российской популяции. Кроме того, было определено, что два пациента имеют протяженную делецию региона 11p13, затрагивающую ген *WT1*, что позволило предположительно поставить им диагноз *синдром WAGR.* Выявлены генетические особенности российских больных с врожденной аниридией: высокая частота случаев без семейной истории, крупных делеций региона 11p13, относительно низкая частота распространенных в других популяциях нонсенс-мутаций. С учетом особенностей спектра мутаций и зарубежного опыта разработан протокол диагностики одного из ВПР глаза — аниридии.

Список литературы

1. Тератология человека: Руководство для врачей / 2-е изд-е, перераб. и доп. — М.: Медицина, 1991.
2. Хлебникова О.В., Дадали Е.В. Наследственная патология органа зрения. — М., 2014.
3. Shimo N. et al. Aniridia with a heterozygous PAX6 mutation in which the pituitary function was partially impaired // Intern. Med. — 2014. — Vol. 53(1). — P. 39—42.
4. Netland P.A. et al. Ocular and systemic findings in a survey of aniridia subjects // J. AAPOS. — 2011. — Vol. 15(6). — P. 562—566.
5. Kasmann-Kellner B. Seitz B. Aniridia syndrome: clinical findings, problematic courses and suggestions for optimization of care («aniridia guide») // Ophthalmologe. — 2014. — Vol. 111(12). — P. 1145—1156.
6. Kokotas H., Petersen M.B. Clinical and molecular aspects of aniridia // Clin. Genet. — 2010. — Vol. 77(5). — P. 409—420.
7. Gronskov K. et al. Population-based risk estimates of Wilms tumor in sporadic aniridia. A comprehensive mutation screening procedure of PAX6 identifies 80% of mutations in aniridia // Hum. Genet. — 2001. — Vol. 109(1). — P. 11—18.
8. Ito Y.A. et al. Severe molecular defects of a novel FOXC1 W152G mutation result in aniridia // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2009. — Vol. 50(8). — P. 3573—3579.
9. Semina E.V. et al. A novel homeobox gene PITX3 is mutated in families with autosomal-dominant cataracts and ASMD // Nat. Genet. — 1998. — Vol. 19(2). — P. 167—170.
10. Sadagopan K.A. et al. Anirdia-like phenotype caused by 6p25 dosage aberrations // Am. J. Med. Genet. A, 2015. — Vol. 167A(3). — P. 524—528.
11. Chang T.C. et al. Axenfeld-Rieger syndrome: new perspectives // Br. J. Ophthalmol. — 2012. — Vol. 96(3). — P. 318—322.
12. Hingorani M., Hanson I., van Heyningen V. Aniridia // Eur. J. Hum. Genet. — 2012. — Vol. 20(10). — P. 1011—1017.
13. Qin L. et al. Detection and Quantification of Mosaic Mutations in Disease Genes by Next-Generation Sequencing // J. Mol. Diagn. — 2016.
14. Wawrocka A. et al. 11p13 deletions can be more frequent than the PAX6 gene point mutations in Polish patients with aniridia // J. Appl. Genet. — 2013. — Vol. 54(3). — P. 345—351.
15. Park S.H. et al. Molecular analysis of the PAX6 gene for congenital aniridia in the Korean population: identification of four novel mutations // Mol. Vis. — 2012. — 18. — P. 488—494.
16. Ramirez-Miranda A., Zenteno J.C. PAX6 gene intragenic deletions in Mexican patients with congenital aniridia // Mol. Vis. — 2006. — 12. — P. 318—323.
17. Desmet F.O. et al. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals // Nucleic Acids Res. — 2009. — Vol. 37(9). — P. e67.
18. Richards S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the

American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology // Genet. Med. — 2015. — Vol. 17(5). — P. 405—424.

19. Redeker E.J. et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) enhances the molecular diagnosis of aniridia and related disorders // Mol. Vis. — 2008. — 14. — P. 836—840.

20. Willems T. et al. The landscape of human STR variation // Genome Res. — 2014. — Vol. 24(11). — P. 1894—1904.

21. Glaser T. et al. PAX6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects // Nat. Genet. — 1994. — Vol. 7(4). — P. 463—471.

22. Martha A. et al. Three novel aniridia mutations in the human PAX6 gene // Hum. Mutat. — 1995. — Vol. 6(1). — P. 44—49.

23. Davis A., Cowell J.K. Mutations in the PAX6 gene in patients with hereditary aniridia // Hum. Mol. Genet. — 1993. — Vol. 2(12). — P. 2093—2097.

24. Vincent M.C. et al. Screening for PAX6 gene mutations is consistent with haploinsufficiency as the main mechanism leading to various ocular defects // Eur. J. Hum. Genet. — 2003. — Vol. 11(2). — P. 163—169.

25. Axton R.A. et al. Combined SSCP/heteroduplex analysis in the screening for PAX6 mutations // Mol. Cell Probes. — 1997. — Vol. 11(4). — P. 287—292.

26. Skeens H.M., Brooks B.P., Holland E.J. Congenital aniridia variant: minimally abnormal irides with severe limbal stem cell deficiency // Ophthalmology. — 2011. — Vol. 118(7). — P. 1260—1264.

27. Dubey S.K. et al. Mutational analysis and genotype-phenotype correlations in southern Indian patients with sporadic and familial aniridia // Mol. Vis. — 2015. — 21. — P. 88—97.

28. Prosser J., van Heyningen V. PAX6 mutations reviewed // Hum. Mutat. — 1998. — Vol. 11(2). — P. 93—108.

29. Lek M. et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans // bioRxiv. — 2015. — 030338+.

30. Ansari M. et al. Genetic Analysis of 'PAX6-Negative' Individuals with Aniridia or Gillespie Syndrome // PLoS One. — 2016. — Vol. 11(4). — P. e0153757.

Study of genetics and design of the test-system for diagnosis of eye anterior chamber hereditary disorders: the case of congenital aniridia

Vasilyeva T.A.[1], Khlebnikova O.V.[1], Marakhonov A.V.[1,2], Petrova N.V.[1], Voskresenskaya A.A.[3], Pozdeyeva N.A.[3], Krynskaya I.A.[1], Kozlova Yu.O.[1], Ryadninskaya N.V.[1], Chukrova A.L.[1], Shilova N.V.[1], Zinchenko R.A.[1,4]

[1] — Federal State Budgetary Institution «Research Center for Medical Genetics, Moscow
[2] — Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Moscow
[3] — Cheboksary branch of S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Cheboksary
[4] — Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

Importance. Congenital malformations are the main cause of disability in infancy. Aniridia (OMIM #106210) is a severe autosomal dominant congenital disorder. Aniridia is mainly associated with pathogenic variants in the PAX6 gene. *Objective.* To investigate the mutational and clinical spectra of congenital aniridia in a cohort of Russian patients. To make a design of a protocol for diagnosis of congenital aniridia. *Design, Setting and Participants.* 34 patients with congenital aniridia from 27 unrelated families were analysed. DNA-diagnosis included sequencing of all coding exons of *PAX6* gene as well as analysis of large 11p13 region deletions. *Results.* 22 sporadic and 12 familial cases of congenital aniridia patients underwent detailed ophthalmic examination and molecular diagnosis. Large 11p13 deletion affecting *PAX6* and *WT1* genes was identified in two patients, therefore they were diagnosed with WAGR syndrome. Molecular analysis involved Sanger sequencing of all PAX6 exons, as well as Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA), Loss Of Heterozygosity (LOH) assays and FISH analysis. Small intragenic mutations in PAX6 gene were identified in 23 patients including 7 novel and 8 different previously reported changes. Large deletions were found in the remaining 11 patients. This allowed designing the protocol for congenital aniridia diagnosis. *Conclusions and Relevance.* Mutation detection rate is 100% in the current study. The protocol for diagnosis of congenital aniridia was designed on the basis of genetic peculiarities in Russian aniridia patients.

Key words: medical genetics, hereditary diseases, the organ of vision, aniridia, WAGR syndrome, a test system, major chromosomal aberrations, copy number variations, FISH analysis, loss of heterozygosity analysis, mutations