

УДК 575.1:616.28-008.14

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРИЧИНЫ И КЛИНИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ БРАНХИО-ОТО-РЕНАЛЬНОГО СИНДРОМА

© 2019 г. О. Л. Миронович<sup>1</sup>, \*, Е. А. Блинец<sup>1</sup>, Т. Г. Маркова<sup>2</sup>, Н. Н. Алексеева<sup>2</sup>,  
Т. И. Голубева<sup>3</sup>, О. П. Рыжкова<sup>1</sup>, А. В. Поляков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Медико-генетический научный центр, Москва, 115478 Россия

<sup>2</sup>Российский научно-практический центр аудиологии и слухопротезирования  
Федерального медико-биологического агентства России, Москва, 117513 Россия

<sup>3</sup>Северодвинская городская детская клиническая больница, Северодвинск, 164504 Россия

\*e-mail: mironovich\_333@mail.ru

Поступила в редакцию 18.06.2018 г.

После доработки 04.09.2018 г.

Принята к публикации 24.09.2018 г.

Бранхио-ото-рэнальный (БОР) синдром – аутосомно-доминантное заболевание, характеризующееся сочетанием нарушения слуха с преаурикулярными ямками, шейными свищами или кистами и аномалиями почек различного типа. Мутации в гене *EYAI* обуславливают до 40% случаев БОР-синдрома. В данной работе впервые представлено подробное клиническое описание и молекулярно-генетическое исследование БОР-синдрома в Российской Федерации среди восьми российских пациентов из четырех неродственных семей. У трех пациентов обнаружены ранее не описанные патогенные варианты (с.394C>T (p.Gln132\*), с.519delT (p.Gln174Asnfs\*66), с.1360G>A (p.Gly454Ser)) в гене *EYAI*. Так же проведен анализ впервые выявленного в более раннем исследовании патогенного варианта с.858delC (p.Leu286Leufs\*79). Результаты, полученные в настоящей статье, демонстрируют значительный вклад генетической патологии, обусловленной мутациями в гене *EYAI*, в заболеваемость БОР-синдромом у российских больных. Частота встречаемости клинических признаков больших диагностических критериев БОР-синдрома у российских пациентов соответствует зарубежным данным.

**Ключевые слова:** бранхио-ото-рэнальный синдром (БОР-синдром), ген *EYAI*.

**DOI:** 10.1134/S0016675819050114

Бранхио-ото-рэнальный синдром (БОР-синдром, синдром Мельника–Фрейзера) – редкое наследственное аутосомно-доминантное заболевание, характеризующееся проявлениями дизэмбриогенеза производных жаберных дуг (околоушные ямки и шейные свищи или кисты, пороки развития наружного и среднего уха) зачастую в сочетании с патологией почек и/или иных органов [1, 2]. Впервые подробно признаки синдрома описали американский генетик М. Melnick в 1975 г. [3] и канадский генетик F.C. Fraser в 1978 г. [2]. Сегодня для постановки клинического диагноза используются большие и малые диагностические критерии, предложенные Chang с соавт. в 2004 г. [4]. Большие критерии включают наиболее частые при синдроме аномалии: потерю слуха, преаурикулярные ямки, аномалии почек (гипоплазия/агенезия, поликистоз, ротация почек, аномалии чашечно-лоханочной системы), свищи шеи и стеноз наружного слухового канала. Малые критерии включают аплазию слезного протока, расщелину неба, ретрогнатия, врожденную дисплазию тазо-

бедренного сустава, паралич лицевого нерва, слезотечение (gustatory lacrimation) и кисты поджелудочной железы. Наличие трех больших критериев или сочетание двух больших и двух малых критериев или двух больших критериев у пробанда и одного большого критерия у его родственника первой степени позволяет поставить клинический диагноз бранхио-ото-рэнального синдрома. Точная распространенность БОР-синдрома неизвестна. В 1976 г. F.C. Fraser обследовал 3640 детей с глубоким нарушением слуха и обнаружил пять детей (0.15%) с семейной историей жаберных фистул и преаурикулярных ямок (1 : 700000) [5]. Четыре года спустя F.C. Fraser обследовал 421 ребенка в монреальской школе для глухих, из них 2% имели клинические признаки БОР-синдрома [6]. Используя эти данные, F.C. Fraser оценил распространенность синдрома в 1 : 40000. Истинная распространенность, вероятно, находится между этими двумя значениями. БОР-синдром клинически гетерогенен, имеет высокую пенетрантность и варьирующую экспрессив-

ность всех признаков синдрома, даже у больных членов одной семьи [7].

БОР-синдром – генетически гетерогенное заболевание, известны три генетические формы синдрома. До 40% случаев БОР-синдрома представляют собой генетический тип 1 (ОМIM#113650), который обусловлен мутациями в гене *EYA1*. Выделен в отдельную нозологическую единицу аллельный и фенотипический вариант БОР-синдрома типа 1 – бронхио-отический синдром (БО-синдром, ОМIM#602588), характеризующийся всеми клиническими признаками БОР-синдрома, но без патологии почек [8]. Доминантные мутации в гене *EYA1* приводят также к сходному заболеванию производных жаберных дуг – отофацио-цервикальному синдрому генетического типа 1 (ОМIM#166780). У 2% больных БОР/БО-синдромом патогенные варианты обнаруживаются в гене *SIX5* [9] (генетический тип 2, ОМIM#610896), у 2.5% больных – в гене *SIX1* (тип 3, ОМIM#608389) [10].

Ген *EYA1* представляет собой человеческий гомолог гена дрозофилы, нокаут которого приводит к полному отсутствию или пороку развития глаз (от англ. “eyes absent” – отсутствие глаз) [11]. В 1989 г. Наан с соавторами описали семью с клиническими признаками БОР-синдрома, у которых была выявлена транслокация на хромосоме 8q [12]. Благодаря данной находке местоположение гена было уточнено S. Abdelhak с соавторами посредством позиционного клонирования, в данной работе также выявлены первые мутации в гене [11]. Ген *EYA1* состоит из 16 экзонов и охватывает область более чем в 150000 пн. Иницирующий транскрипцию АТG-кодон находится в экзоне 3. На сегодняшний день в мире описано около 200 мутаций в гене *EYA1*. Мутации располагаются на всем протяжении гена, “горячих” точек и экзонов в гене нет [13]. Стоит отметить, что взаимосвязи между типом мутаций и наличием или тяжестью клинических признаков не наблюдается. Y. Zhang с соавторами показали, что LOF-варианты (от англ. “loss of function” – потеря функции) в гене *EYA1* не связаны с более тяжелым фенотипом по сравнению с миссенс-вариантами [14].

Ген *SIX1* локализуется на хромосоме 14q23.1, охватывает область в 1376 пн и состоит из двух кодирующих экзонов; на данный момент в мире описано 16 мутаций в гене, при этом одна мутация с.328C>T (p.R110Q) выявлена в шести неродственных семьях в разных этнических группах [10]. Ген *SIX5* локализуется на хромосоме 19q13.32, охватывает область в 3145 пн и состоит из трех кодирующих экзонов. На сегодняшний день зарегистрировано девять патогенных вариантов в данном гене.

Продуктом гена *EYA1* является двухфункциональный белок (The Eyes Absent proteins) – член семейства белков EYA (EYA1–4), компонент кон-

сервативной регуляторной сети (Pax-Six-Eya-Dach (PSEDN)), играющей ключевую роль в развитии многих органов и систем, в частности в морфогенезе глаз, внутреннего уха, почек и жаберных дуг [15, 16]. Гены *EYA* экспрессируются в различных тканях на ранних этапах эмбриогенеза, и хотя у каждого гена своя уникальная картина экспрессии, существует ее обширное перекрытие. Например, исследования на мышах показали, что экспрессия *EYA1*, *EYA2* и *EYA4* выражена в пресомитной мезодерме и мезенхиме головы зародыша, но только *EYA1* и *EYA4* экспрессируются в отических пузырьках [17]. В развивающейся почке мыши картина экспрессии указывает на роль *EYA1* в развитии метанефрических клеток [11]. Уникальной особенностью белков семейства EYA является то, что данные белки выполняют сразу несколько биохимических функций [18]. С-терминальный домен обладает тирозин-фосфатазной активностью и таким образом играет центральную роль в репарации ДНК [19, 20]. N-терминальный домен обладает опосредованной транскрипционной активностью: он не имеет собственной ДНК-связывающей функции, однако является коактиватором белковых продуктов генов семейства Six (*SIX1*, *SIX2*, *SIX3*, *SIX4*, *SIX5*, *SIX6*) – транскрипционных факторов, контролирующих экспрессию генов-мишеней [14]. Данные функции белка EYA1 объясняют его роль в регуляции транскрипции и передаче клеточных сигналов во время органогенеза.

Ранее в 2004 и 2006 гг. соавтором настоящей работы Т.Г. Марковой были опубликованы первые сообщения о российских пациентах с БОР-синдромом, в которых приведено клиническое описание трех неродственных пациентов, у одного из которых клинический диагноз был подтвержден на молекулярно-генетическом уровне – выявлена гетерозиготная мутация в гене *EYA1* – с.858delC (NM\_000503), или с.759delC (NM\_172060) [1, 21]. На сегодняшний день в русскоязычной научной литературе других сообщений о данном синдроме нет. В настоящей работе приведено описание результатов клинического и молекулярно-генетического исследования еще четырех российских случаев БОР-синдрома, а также биоинформатического анализа клинического значения трех выявленных неописанных ранее мутаций в гене *EYA1* и одной мутации, выявленной в более раннем исследовании [1, 21].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Пациенты.* Проводилось клиническое обследование восьми пациентов с БОР-синдромом из четырех неродственных семей. Материалом для молекулярно-генетического исследования явились образцы ДНК четырех пробандов из данных семей, трех родственников с БОР-синдромом и

двух здоровых родителей. Также в описание результатов работы для сравнения и обзора случаев включены данные исследования пациентов из ранней публикации Марковой [1].

**Клиническое обследование.** Все пациенты были клинически обследованы в Российском научно-практическом центре аудиологии и слухопротезирования (Москва). Характер и степень нарушения слуха оценивались с помощью тональной пороговой аудиометрии и тимпанометрии. Обследование так же включало осмотр врача генетика, сурдолога-отоларинголога, компьютерную томографию височной кости (для подтверждения наличия аномалий развития среднего и внутреннего уха) и ультразвуковое исследование почек и осмотр терапевта/нефролога.

**Молекулярно-генетическое исследование.** Выделение геномной ДНК из лейкоцитов периферической крови выполняли с помощью готового набора реактивов Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, США).

Образцы ДНК четырех пробандов исследованы с помощью таргетной MPS-панели “Hearloss” (от англ. hearing loss – потеря слуха), разработанной в лаборатории ДНК-диагностики МГНЦ. В связи с тем, что физические возможности панели были ограничены, в нее были включены 35 частых генов, ответственных за развитие несиндромальной потери слуха и синдромальных форм тугоухости (*STRC, MYO7A, MYO15A,TECTA, SLC26A4, CDH23, USH2A, TMPRSS3, TMC1, COL11A2, OTOF, EYA1, OTOA, PCDH15, PAX3, KCNQ4, LOXHD1, WFS1, ADGRV1, MYH14, MYO6, ACTG1, PTPRO, MYH9, OTOGL, TRIOBP, CLDN14, LRTOMT, DFNB59, TPRN, WHRN, ALMS1, POU3F4, SMPX, CHD7*). Для пробоподготовки использовалась технология AmpliSeq™, представляющая собой ультрамультиплексную ПЦР [22]. Секвенирование проводилось на платформе Ion S5 (Life Technologies, США). Разработанная панель “Hearloss” протяженностью 329.89 тнп включает 1800 ампликонов размером от 125 до 275 пн. Расчетное покрытие кодирующих областей генов по данным разработчика (Ion AmpliSeq Designer) составляет 97.73%.

Обработка данных секвенирования проведена с использованием стандартного автоматизированного алгоритма, предлагаемого ThermoFisher Scientific (Torrent Suite™), а также программного обеспечения Gene-Talk. Фильтрация выявленных вариантов нуклеотидной последовательности проводилась по популяционной частоте: не анализировались варианты с частотой более 1% согласно данным баз проектов 1000 Genomes Project, ESP6500 и Genome Aggregation Database. Интерпретация клинического значения выявленных вариантов нуклеотидной последовательности проводилась согласно “Руководству по интерпретации данных,

полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS)” [23]. Обозначение вариантов гена *EYA1* осуществляли в соответствии с международной номенклатурой HGVS (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>), референсная последовательность мРНК: NM\_000503.5. Частота описанных вариантов среди пациентов с БОР-синдромом и здоровых людей оценивалась с помощью баз данных HGMD® Professional 2017.4 (<https://portal.biobase-international.com>), 1000 Genomes Project (<http://browser.1000genomes.org>), <http://www.ensembl.org>), gnomAD (<http://gnomad.broadinstitute.org>) и NCBI ClinVar, dbSNP. Патогенность выявленных вариантов анализировали с применением интернет-ресурсов, предсказывающих эффекты мутаций: Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org>), PROVEAN, SIFT (<http://provean.jcvi.org>), PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>), NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>) и SpliceFinder (<http://www.umd.be/HSF3/>).

Все кодирующие экзоны и прилегающие экзон-интронные соединения гена *EYA1* полностью покрыты в панели (диапазон покрытия составлял от 10× до 700×). Некодирующий экзон 1 оказался полностью не покрыт. Образец ДНК пробанда, в котором не найдено патогенных и вероятно-патогенных вариантов, был исследован на наличие мутаций в экзоне 1 гена *EYA1* методом прямого автоматического секвенирования по Сенгеру на приборе ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). Наличие патогенных и вероятно-патогенных вариантов, выявленных у пробандов методом MPS, также было проверено данным методом. В качестве матрицы для секвенирования использовали фрагменты ДНК, полученные после проведения ПЦР с использованием оригинальных олигонуклеотидных праймеров (табл. 1), которые синтезировались в ЗАО “Евроген”. ПЦР проводили по стандартному протоколу, описанному ранее [24]. Температура отжига праймеров составила 62°C.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Клиническое описание пациентов с БОР-синдромом*

Клинически обследованы семь пациентов из трех семей и один спорадический случай с признаками БОР-синдрома. Большие клинические признаки синдрома, наблюдаемые у пациентов, представлены в табл. 2. В таблице также представлены дополнительно данные трех российских неродственных пациентов с признаками БОР-синдрома, опубликованные ранее Т.Г. Марковой [1]. Пример аудиограммы пробанда семьи 3 с БОР-синдромом представлен на рис. 1.

Согласно литературным данным нарушение слуха встречается у 93% пациентов с признаками

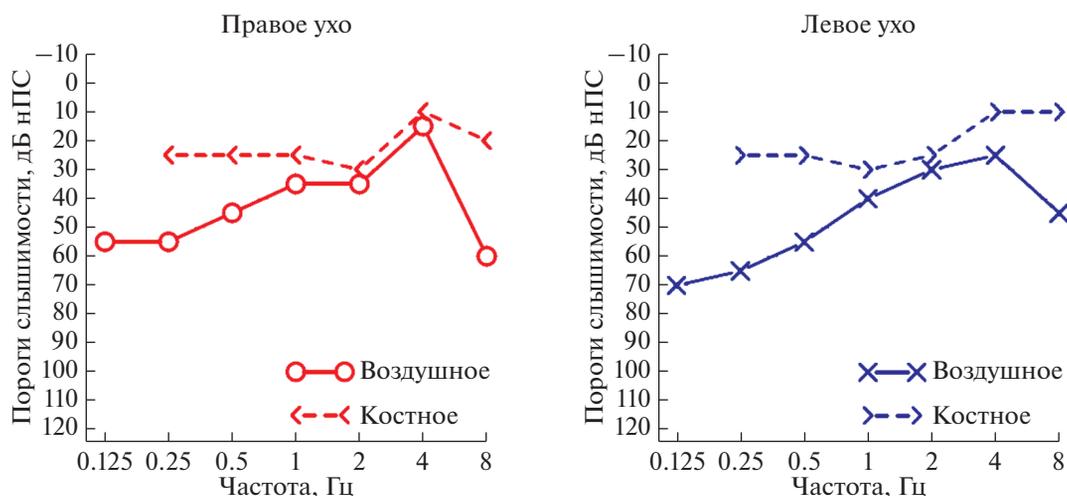
**Таблица 1.** Последовательность праймеров для ПЦР

Фрагмент <i>EYAI</i>	Последовательность олигонуклеотидов, 5' → 3'
Экзон 1	F: CCATGGGCAGACCTACAAGGC R: CAGGACAGCTGTTGTTCAGTCAC
Экзон 5–6	F: CCAAATATCTGAAATTTTCATATGGCC R: CACGCATGCCCATGCGATAAC
Экзон 7	F: CCAGCTTTTGAAAATGGACAGATAG R: GCCTCTAAGCCCAATCCAGTTG
Экзон 14	F: GTTGAAAAATCCTCCAATTAAGGTGC R: GGAATTGTATCTGGACTGTCTTAAC

БОР-синдрома. Данные представлены для молекулярно не подтвержденных выборок. В большинстве случаев наблюдается смешанный тип тугоухости (50%), реже – кондуктивный (30%) и сенсоневральный тип (20%) [25]. Возраст начала нарушений и степень потери слуха варьируют – от раннего детского до середины второго десятилетия жизни, от легкой до тяжелой и практически полной глухоты [1]. У большинства пациентов с БОР-синдромом тугоухость сочетается с аномалиями развития структур внутреннего уха – кохлеарной гипоплазией (63%), широким водопроводом преддверия (46%), луковичеобразным внутренним слуховым проходом (25%) и аномалиями косточек (50%) [25–27]. Преаурикулярные ямки наблюдаются в 70–80% случаев, чашеобразные уши отмечаются у 36% пациентов, шейные фистулы – у 63% пациентов [25, 27]. Данные о встречаемости аномалий почек у пациентов с БОР-синдромом варьируют от 15 до 65% по данным разных авторов [1, 28]. Встречаются как гру-

бые пороки развития почек – такие как двусторонняя агенезия, приводящая к мертворождению, так и менее тяжелые аномалии – гипоплазия почек, гидронефроз, пузырно-мочеточниковый рефлюкс.

У шести исследуемых нами семей был диагностирован классический БОР-синдром с присутствием всех клинических признаков больших диагностических критериев, предложенных Chang с соавт. [4]. В семье 7 (см. табл. 2) наблюдалось сочетание преаурикулярных ямок и глухоты без других признаков синдрома. Таким образом, тугоухость наблюдалась у всех пациентов и степень нарушения слуха варьировала от легкой до тяжелой. Преаурикулярные ямки и свищи присутствовали у 10 пациентов (91%). В большинстве случаев наблюдался смешанный тип тугоухости (55%), реже – кондуктивный (27%) и сенсоневральный тип (18%). Не у всех пациентов было проведено КТ височных костей, однако у всех исследованных



**Рис. 1.** Аудиограмма пробанда семьи 3 с бранхио-ото-ренальным синдромом. С обеих сторон зарегистрирован костно-воздушный интервал >20 дБ на низких частотах и на 8 кГц, свидетельствующий о наличии тугоухости кондуктивного типа.

Таблица 2. Клиническая характеристика пациентов с БОР-синдромом

Клинические признаки	Семья 1			Семья 2		Семья 3	Семья 4		Семья 5**	Семья 6**	Семья 7**
	Пробанд*	Дочь	Сын	Мать	Пробанд*	Пробанд*	Пробанд*	Сын	Пробанд*	Пробанд*	Пробанд*
Возраст на момент осмотра, лет	38	8	6	30	8	8	25	3	30	20	нд
Оттопыренные ушные раковины	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–
Преаурикулярные ямки и кисты											
двусторонние	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
односторонние										+	
Шейные кисты и свищи											
двусторонние		+	+							+	–
односторонние	+			+	+	+	+	+	+		–
Кондуктивная (К)/смешанная (С)/нейросенсорная (Н) тугоухость двусторонняя	+С	+К	+К	+С	+С	+К	+С	+С	+Н	+С	+Н
Костно-воздушный разрыв	+	+	+	+	+	+	+	нд	нд	нд	нд
Степень тугоухости (левое/правое ухо)	III–IV	III	III	III–IV	III/I	I	II	I	III–IV	нд	нд
Аномалии, выявленные при КТ височных костей	+а	нд	+а	нд	+б	+в	нд	нд	нд	нд	нд
Патология почек	+г	–	–	+г	–	+д	+г	–	+д	–	–
Семейный анамнез	+			+		–	+		+	+	+

\* Пробанд, для которого проведен поиск мутаций в гене EYA1.

\*\* Данные трех российских неродственных пациентов с признаками БОР-синдрома, опубликованные ранее Т.Г. Марковой [1].  
Примечание. “+” – признак присутствует; “–” – признак отсутствует; “нд” – нет данных, так как исследование не проводилось; “а” – широкий водопровод преддверия, фронтальный полукружный канал четко не визуализируется, внутренний слуховой проход расширен; “б” – барабанная полость неправильной формы, длинный отвод сток наковальни неправильной формы, истончен, улитка уменьшена в размерах, отмечается дисплазия горизонтального полукружного канала, расширен водопровод преддверия и ямки эндолимфатического мешка; “в” – аномалии развития слуховых косточек, длинный отросток наковальни неправильной формы, истончен, отмечается гипоплазия улитки и заднего полукружного канала, внутренний слуховой проход расширен и имеет диаметр 6 мм с обеих сторон; “г” – частые обострения пиелонефрита; “д” – атенезия правой почки.

**Таблица 3.** Варианты гена *EYA1*, являющиеся причиной БОР-синдрома у российских пациентов

Номер семьи пробанда	Название варианта	Локализация в гене	Эффект	Клиническое значение**	Критерии патогенности
1	c.519delT	Экзон 7	p.Gln174Asnfs*66	Патогенный	PVS1 + PM2 + PP4
2	c.394C>T	Экзон 6	p.Gln132*	»	PVS1 + PM2 + PP4
3	c.1360G>A	Экзон 14	p.Gly454Ser и/или нарушение сплайсинга	»	PS2 + PM1 + PM2 + PP3 + PP4
5*	c.858delC	Экзон 10	p.Leu286Leufs*79	»	PVS1+ PM2 + PP4

\* Мутация была обнаружена ранее V. Migliosi в соавторстве с Т.Г. Марковой [21].

\*\* Обозначения приведены в соответствии с российскими рекомендациями по интерпретации и классификации вариантов нуклеотидной последовательности [23].

лиц выявлены изменения структур среднего и внутреннего уха, характерные для БОР-синдрома, такие как гипоплазия улитки и широкий водопровод преддверия. Патология почек наблюдалась реже других признаков: в 2 случаях (18%) – агенезия правой почки, в 3 случаях (27%) – частые обострения пиелонефрита, которые являются результатом пузырно-мочеточникового рефлюкса. Таким образом, клинические признаки и частота их встречаемости у российских пациентов с БОР-синдромом соответствует зарубежным данным.

#### *Молекулярно-генетическое исследование пациентов с БОР-синдромом*

Образцы ДНК четырех пробандов исследованы с использованием таргетной MPS-панели “Hearloss” (см. Материалы и методы). В результате у трех пациентов в гене *EYA1* обнаружены гетерозиготные мутации: c.394C>T, c.519delT и c.1360G>A. Данные варианты нуклеотидной последовательности не были описаны ранее в литературе и не представлены в базах данных HGMD, dbSNP, 1000 Genomes Project и gnomAD (см. Материалы и методы). В табл. 3 показаны результаты проведенного биоинформатического анализа клинического значения как трех вариантов, выявленных в настоящей работе, так и варианта c.858delC, выявленного ранее у российского пациента в работе V. Migliosi в соавторстве с Т.Г. Марковой [1, 21].

Среди вариантов в гене *EYA1*, описанных ранее в литературе, 45 миссенс-мутаций, 36 точковых делеций, 22 точковые вставки, 5 точковых инделов, 29 нонсенс-мутаций, 3 мутации, приводящие к потере стоп-кодона, 30 мутаций сайтов сплайсинга, 25 протяженных делеций, 2 протяженные вставки и 6 сложных перестроек включены в базу данных HGMD® Professional 2017.4 как “мутации, обуславливающие заболевание”. Таким образом, в базе HGMD зарегистрировано 116 нуль-вариантов (мутаций, обуславливающих образование преждевременного стоп-кодона, сдвиг

рамки считывания, изменение канонических +/-1 или 2 сайтов сплайсинга) и 45 миссенс-мутаций. При этом по состоянию на январь 2017 г. в базе ClinVar в гене *EYA1* среди доброкачественных (или вероятно-доброкачественных) вариантов не описано ни одного нуль-варианта и зарегистрировано 8 миссенс-замен. Эти данные демонстрируют, что нуль-варианты и миссенс-мутации в гене *EYA1* являются распространенной причиной БОР/БО-синдрома, и частота доброкачественных мутаций указанных функциональных типов в гене *EYA1* сравнительно низка. Поэтому при классификации обнаруженных неописанных нуль- и миссенс-вариантов применимы очень сильный PVS1 и поддерживающий PP2 критерии патогенности согласно рекомендациям для классификации патогенных вариантов [23].

Три из анализируемых в настоящей работе варианта нуклеотидной последовательности – нонсенс-мутация c.394C>T (p.Gln132\*) и приводящие к сдвигу трансляционной рамки считывания и образованию преждевременного стоп-кодона делеции c.519delT (p.Gln174Asnfs\*66) и c.858delC (p.Leu286Leufs\*79) – обуславливают отсутствие синтеза полноразмерного белка, т.е. являются нуль-мутациями. Четвертый вариант нуклеотидной последовательности, c.1360G>A (p.Gly454Ser), является миссенс-вариантом, который также может влиять на сплайсинг, поскольку затрагивает последний нуклеотид экзона 14 – донорный сайт сплайсинга. Все варианты локализируются, вероятно, в функционально значимых участках последовательности: анализ выровненных нуклеотидных и белковых последовательностей, гомологичных гену *EYA1* и белку EYA1, показал эволюционную консервативность областей локализации мутаций среди почти всех классов животных (от червей до человека) (рис. 2). Белок EYA1 состоит из С-терминального домена, состоящего из 271 аминокислоты, охватывающего последние 8 экзонов белка (EYA-domain – ED), и N-терминального домена (N-terminal domain – NTD). С-терминальный домен является высоко-

species	match	gene	aa alignment	
Human			454EIQ NTKYKNNVGGGL	LGPAKREAWL
mutated	not conserved		454EIQ NTKYKNNVGSLL	LGPAKREAWL
Ptroglyodytes	all identical	<a href="#">ENSPTRG00000020337</a>	454EIQ NTKYKNNVGGGL	LGPAKREAWL
Mmulatta	not conserved	<a href="#">ENSMUG00000007576</a>	453EIQ NTKYKNNIGGL	LGPAKREAWL
Fcatus	no alignment	<a href="#">ENFCAG00000000245</a>	n/a	
Mmusculus	all identical	<a href="#">ENSMUSG00000025932</a>	453EIQ NTKYKNNVGGGL	LGPAKREAWL
Ggallus	all identical	<a href="#">ENSGALG00000015622</a>	464EIQ NTKYKNNVGGGL	LGPAKREAWL
Trubripes	all identical	<a href="#">ENSTRUG00000012298</a>	469EIQ TTYKNNVGGGL	LG
Drerio	all identical	<a href="#">ENSDARG00000014259</a>	471EIQ TTYKNNVGGGL	LG
Dmelanogaster	not conserved	<a href="#">FBgn0000320</a>	625DIY NSYRGNVGTLL	
Celegans	all identical	<a href="#">C49A1.4</a>	354QFYTENSTKNDVAGFKQEQNGNFEL	
Xtropicalis	all identical	<a href="#">ENSXETG00000015955</a>	488 YKNNVGGGL	LGPAKREAWL

p.Gly454Ser

species	match	gene	aa alignment	
Human			174FLSYGTSFS TP	QPGQAPYSYQMGGSSFTTSSGIYTGNN
mutated	partly conserved		38 NSHINSNSM TP	NGTEV--KTIPMSSEETAST---TADG
Ptroglyodytes	all conserved	<a href="#">ENSPTRG00000020337</a>	174FLSYGTSFS TP	QPGQAPYSYQMGGSSFTTSSGIYTGNN
Mmulatta	partly conserved	<a href="#">ENSMUG00000007576</a>	173FLSYGTSFS TP	QPGQAPYSYQMGGSSFTTSSGIYTGNN
Fcatus	partly conserved	<a href="#">ENFCAG00000000245</a>	106FLSYGTSFSG TP	QPGQAPYSYQMGGSSFTTSSGIYTGNN
Mmusculus	partly conserved	<a href="#">ENSMUSG00000025932</a>	173FLSYGTSFSG TP	QPGQAPYSYQMGGSSFTTSSGIYTGNN
Ggallus	partly conserved	<a href="#">ENSGALG00000015622</a>	188FLSYGASFS TP	QPGQAPYSYQMGGSSFTTSSGIYAGNN
Trubripes	partly conserved	<a href="#">ENSTRUG00000012298</a>	188FLSYGSGFT TP	QPGQAPYSYQMGGSSFTTSSGIYAGNN
Drerio	partly conserved	<a href="#">ENSDARG00000014259</a>	190FLSYSSSFS TP	QPGQAPYSYQMGGSSFTTSSGIYAGNN
Dmelanogaster	partly conserved	<a href="#">FBgn0000320</a>	294YSGYGTPYA AATAAROAKM	PEAAAAA-----AAYLTPSYAAAGNN
Celegans	partly conserved	<a href="#">C49A1.4</a>	44 FSMATTSDDSSTWTA	LPASQGGDKDPTVDLAAISEAVGSTS
Xtropicalis	partly conserved	<a href="#">ENSXETG00000015955</a>	207FLSYGSSFS TP	QPGQAPYSYQMGGSSFTTSSGIYAGNN

p.Gln174Asnfs\*66

species	match	gene	aa alignment	
Human			287EYSTIH	SPSTPIKDSDSRLRRG SD
mutated	all conserved		287EYSTIH	SPSTPIK SD
Ptroglyodytes	all identical	<a href="#">ENSPTRG00000020337</a>	287EYSTIH	SPSTPIKDSDSRLRRG SD
Mmulatta	all identical	<a href="#">ENSMUG00000007576</a>	286EYNTIH	SPSTPIKDSDSRLRRG SD
Fcatus	all identical	<a href="#">ENFCAG00000000245</a>	219EYSTIH	SPSTPIKDSDSRLRRG SD
Mmusculus	partly conserved	<a href="#">ENSMUSG00000025932</a>	286EYSTIH	SPSTPIKDSRLRRG SD
Ggallus	partly conserved	<a href="#">ENSGALG00000015622</a>	296EYSTIH	SPSTPIKDSDSRLRRS SD
Trubripes	partly conserved	<a href="#">ENSTRUG00000012298</a>	302 STIH	SPSTPIKDSDSRLRRR SD
Drerio	partly conserved	<a href="#">ENSDARG00000014259</a>	304 STIH	SPSTPIKDSDSRLRRR SD
Dmelanogaste	partly conserved	<a href="#">FBgn0000320</a>	407VHQTH	SPHSPPIEPTGSGIGPLGNVSAIAAALNSG
Celegans	partly conserved	<a href="#">C49A1.4</a>	160YYTNLRGGTAAPYYNPLNATTAAYAA	SVASSLGIVNIGTS SD
Xtropicalis	partly conserved	<a href="#">ENSXETG00000015955</a>	320EYSTIH	SPSTPIKDSDSRLRRS SD

p.Ile286Leufs\*79

species	match	gene	aa alignment	
Human			132ATAYATYPQPGQPYGISSY	GALWAGIK TEGGLSQSQSPGQTGFLSYGTSFS
mutated	no alignment		n/a	
Ptroglyodytes	all identical	<a href="#">ENSPTRG00000020337</a>	132ATAYATYPQPGQPYGISSY	GALWAGIK TEGGLSQSQSPGQTGFLSYGTSFS
Mmulatta	partly conserved	<a href="#">ENSMUG00000007576</a>	131ATAYATYPQPGQPYGISSY	GALWAGIK TEGGLSQSQSPGQTGFLSYGTSFS
Fcatus	partly conserved	<a href="#">ENFCAG00000000245</a>	64 QPGQPYGISSY	GALWAGIK TEGGLSQSQSPGQTGFLSYGTSFS
Mmusculus	partly conserved	<a href="#">ENSMUSG00000025932</a>	131ATAYATYPQPGQPYGISSY	GALWAGIK TEGGLSQSQSPGQTGFLSYGTSFS
Ggallus	partly conserved	<a href="#">ENSGALG00000015622</a>	146ATAYATYPQPGQPYGISSY	G-----IK TEGGLSQSQSPGQTGFLSYGTSFS
Trubripes	partly conserved	<a href="#">ENSTRUG00000012298</a>	151AAAYASYPQPGQPYGISSY	G-----IK TEGGLSQSQSPGQTGFLSYGTSFS
Drerio	partly conserved	<a href="#">ENSDARG00000014259</a>	153AAAYGYTPQPGQPYGISSY	G-----IK TEGGLSQSQSPGQTGFLSYGTSFS
Dmelanogaster	no alignment	<a href="#">FBgn0000320</a>	n/a	
Celegans	partly conserved	<a href="#">C49A1.4</a>	164GTA-APYYNPLNATTAAYV	ASTASSLGTAVNLGSSDSESTGVPSTVTSFS
Xtropicalis	partly conserved	<a href="#">ENSXETG00000015955</a>	164ATAYATYPQPGQPYGISSY	GALWAGIK TEGGLSQSQSPGQTGFLSYGTSFS

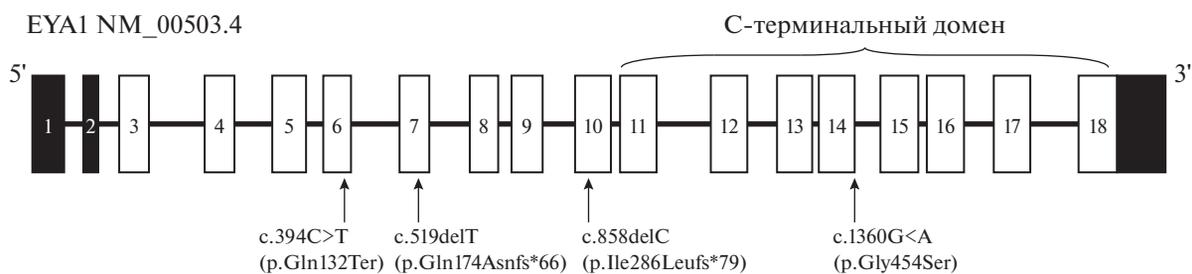
p.Gln132\*

Рис. 2. Анализ консервативности выявленных вариантов нуклеотидной последовательности в гене *EYA1* с помощью программы MutationTaster.

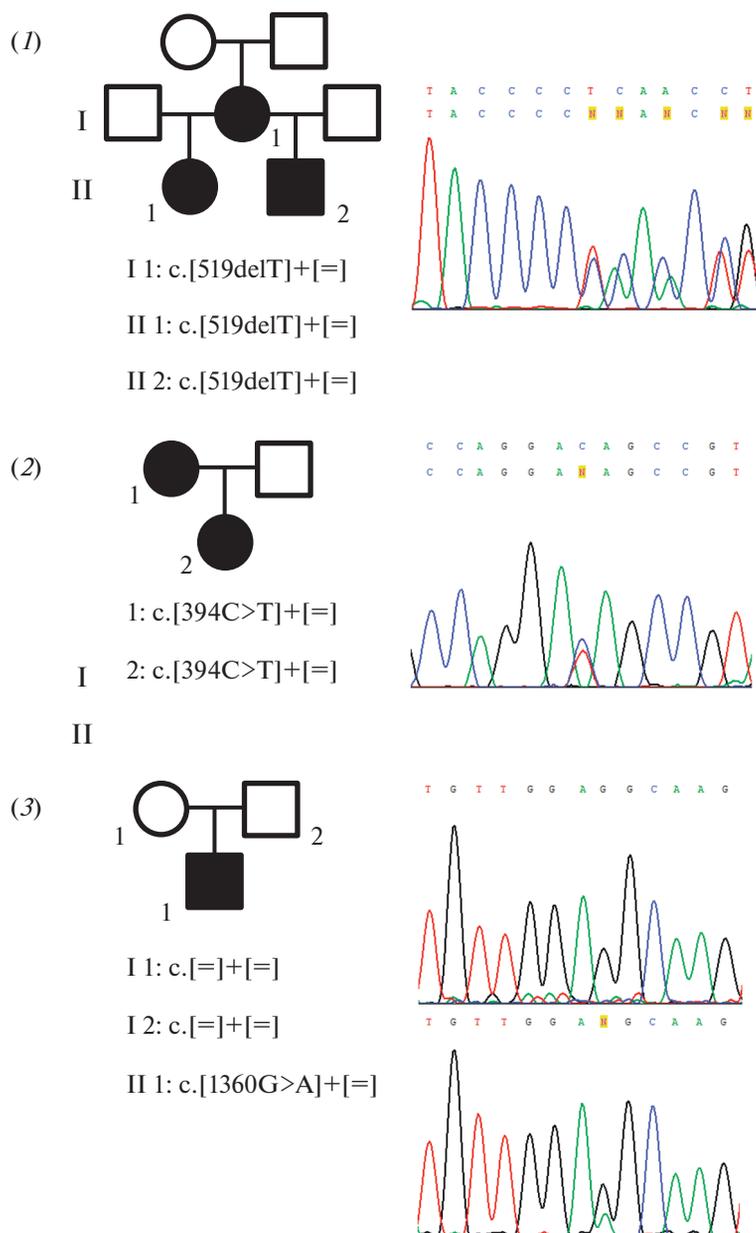
консервативным — он гомологичен гену дрозофилы и его структура идентична в пределах семейства белков EYA [1, 19, 29]. N-терминальный домен (или euVR — от англ. “eu variable region”) является более вариабельным внутри семейства [21, 29]. Вариант с.1360G>A локализуется в экзоне 14 гена *EYA1* и, таким образом, затрагивает C-терминальный домен, что указывает в пользу его патогенности. Три других мутации, приводящие к образованию преждевременного стоп-кодона, локализируются в экзонах 6, 7, 10 и вероятно приводят к образованию усеченного белка EYA1, у которого отсутствует ED-домен (рис. 3).

Анализ эффекта *in silico* четырех анализируемых мутаций с помощью биоинформатического интернет-ресурса MutationTaster и миссенс-мута-

ции дополнительно с помощью ресурсов PolyPhen2, PROVEAN, SIFT и UMD-predictor показал патогенный эффект всех мутаций с высокой достоверностью предсказания. Исключением является результат анализа миссенс-мутации с использованием ресурса PolyPhen-2, который показал нейтральный эффект с чувствительностью 0.93 и специфичностью 0.86. Программы, предсказывающие влияние на сплайсинг (NetGene2 и SpliceFinder), при анализе миссенс-мутации показали наличие нарушения процесса сплайсинга: SpliceFinder — исчезновение донорного сайта сплайсинга, NetGene2 — снижение вероятности использования истинного донорного сайта с 80% (при анализе нормальной последовательности) до 0% (при анализе последовательности с мутаци-



**Рис. 3.** Локализация выявленных в данной работе и в работе Марковой [1, 21] вариантов нуклеотидной последовательности в гене *EYA1*.



**Рис. 4.** Родословные, генотипы и фрагменты хроматограмм семей 1, 2, 3. Верхняя последовательность (хроматограмма – семья 3) соответствует дикому типу, а нижняя соответствует последовательности с новой мутацией.

ей), т.е. исчезновение сайта. Отсутствие сплайсинга интрона 14, вероятно, приводит к вставке последовательности данного интрона длиной 962 пн в последовательность мРНК и сдвигу трансляционной рамки считывания с образованием преждевременного стоп-кодона. Для остальных трех мутаций программы NetGene2 и SpliceFinder показали незначительное влияние на сплайсинг или его отсутствие. Таким образом, биоинформатический анализ показал с высокой достоверностью, что все четыре исследуемых варианта гена *EYA1* представляют собой ноль-мутации, приводящие к нарушению синтеза белка.

Наличие трех вариантов нуклеотидной последовательности гена *EYA1*, выявленных методом MPS, было подтверждено методом прямого автоматического секвенирования по Сэнгеру (рис. 4). Также на наличие данных вариантов нуклеотидной последовательности исследованы образцы ДНК членов семей пробандов. В семье 2 вариант с.394C>T (p.Gln132\*) выявлен у пробанда, а также у сына и дочери пробанда с БОР-синдромом. В семье 1 вариант с.519delT (p.Gln174Asnfs\*66) выявлен у пробанда и его матери с БОР-синдромом. В семье со спорадическим случаем заболевания (№ 3) вариант с.1360G>A (p.Gly454Ser) выявлен у пробанда и отсутствовал у его здоровых родителей. Таким образом, к данному варианту стало возможным применение сильного критерия патогенности PS2 (*de novo* вариант).

Полученные данные клинического, анамnestического, семейного и молекулярного исследований в совокупности позволяют классифицировать нонсенс-мутацию с.394C>T (p.Gln132\*), делеции с.519delT (p.Gln174Asnfs\*66) и с.858delC (p.Ple286Leufs\*79) и миссенс-мутацию с.1360G>A (p.Gly454Ser) как патогенные варианты и рассматривать все четыре мутации как причину БОР-синдрома согласно практическим рекомендациям [23].

Таким образом, вклад генетической патологии, обусловленной мутациями в гене *EYA1*, в заболеваемость БОР-синдромом среди исследованных российских пациентов составил 57% (4 из 7 неродственных пробандов), что соответствует зарубежным данным, согласно которым около половины случаев синдрома составляет данная генетическая форма [8]. У остальных трех пробандов, у которых не выявлены патогенные и вероятно-патогенные варианты гена *EYA1*, возможно наличие протяженных делеций/дупликаций или мутации в регуляторных областях гена *EYA1*, или мутации в других известных (*SIX1* и *SIX5*) или неизвестных генах БОР-синдрома. В связи с низкой информативностью исследования генов *SIX1* и *SIX5* у пациентов с БОР-синдромом для данных случаев целесообразно продолжение исследования методами полногеномного или полноэкзомного секвенирования.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маркова Т.Г. Клинические признаки бранхио-отorenального синдрома в семье с положительными результатами исследования гена *EYA1* // Вестн. оториноларингологии. 2006. № 6. С. 25–28.
2. Fraser F.C., Ling D., Clogg D., Nogrady B. Genetic aspects of the BOR syndrome—branchial fistulas, ear pits, hearing loss, and renal anomalies // Am. J. Med. Genet. 1978. № 2. P. 241–252.
3. Melnick M., Bixler D., Silk K. et al. Autosomal dominant branchiootorenal dysplasia // Birth Defects Orig. Art. Ser. 1975. V. 11. № 5. P. 121–128.
4. Chang E.H., Menezes M., Meyer N.C. et al. Branchio-oto-renal syndrome: the mutation spectrum in *EYA1* and its phenotypic consequences // Hum. Mutat. 2004. № 23. P. 582–589.
5. Fraser G.R. The Causes of Profound Deafness in Childhood. Baltimore, MD: Johns Hopkins Univ. Press, 1976.
6. Fraser F.C., Sproule J.R., Halal F. Frequency of the branchio-oto-renal (BOR) syndrome in children with profound hearing loss // Am. J. Med. Genet. 1980. V. 7. № 3. P. 341–349.
7. Castiglione A., Melchionda S., Carella M. et al. *EYA1*-related disorders: two clinical cases and a literature review // Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. 2014. V. 78. № 8. P. 1201–1210. doi 10.1016/j.ijporl.2014.03.032
8. Smith R.J.H. Branchiootorenal spectrum disorders. Gene Reviews™ (Internet). University of Washington, Seattle, WA, 1999. Mar 19 [Updated 2013] Jun 30; Cited 23 February 2014. Available from URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1380/>.
9. Hoskins B.E., Cramer C.H., Silvius D. et al. Transcription factor *SIX5* is mutated in patients with branchio-oto-renal syndrome // Am. J. Hum. Genet. 2007. V. 80. P. 800–804.
10. Kochhar A., Orten D.J., Sorensen J.L. et al. *SIX1* mutation screening in 247 branchio-oto-renal syndrome families: a recurrent missense mutation associated with BOR // Hum. Mut. 2008. V. 29. P. 565. doi 10.1002/humu.20714
11. Abdelhak S., Kalatzis V., Heilig R. et al. A human homologue of the *Drosophila* eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family // Nature Genet. 1997. V. 15. P. 157–164.
12. Haan E.A., Hull Y.J., White S. et al. Tricho-rhino-phalangeal and branchio-oto syndromes in a family with an inherited rearrangement of chromosome 8q // Am. J. Med. Genet. 1989. V. 32. P. 490–494.
13. Ruf R.G., Xu P.X., Silvius D. et al. *SIX1* mutations cause branchio-oto-renal syndrome by disruption of *EYA1*-*SIX1*-DNA complexes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 8090–8095.
14. Zhang Y., Knosp B.M., Maconochie M. et al. A comparative study of *Eya1* and *Eya4* protein function and its implication in branchio-oto-renal syndrome and DFNA10 // J. Assoc. Res. Otolaryngol. 2004. № 5. P. 295–304.
15. Wawersik S., Maas R.L. Vertebrate eye development as modeled in *Drosophila* // Hum. Mol. Genet. 2000. V. 9. P. 917–925.

16. Fortunato S.A., Leininger S., Adamska M. Evolution of the Pax-Six-Eya-Dach network: the calcisponge case study // *Evodevo*. 2014. V. 5. P. 23. doi 10.1186/2041-9139-5-23
17. Wayne S., Robertson N.G., DeClau F. et al. Mutations in the transcriptional activator EYA4 cause late-onset deafness at the DFNA10 locus // *Hum. Mol. Genet.* 2001. V. 10. № 3. P. 195–200.
18. Rebay I., Silver S.J., Tootle T.L. New vision from Eyes absent: transcription factors as enzymes // *Trends Genet.* 2005. V. 21. № 3. P. 163–171.
19. Rayapureddi J.P., Kattamuri C., Steinmetz B.D. et al. Eyes absent represents a class of protein tyrosine phosphatases // *Nature*. 2003. V. 426. P. 295–298.
20. Tootle T.L., Silver S.J., Davies E.L. et al. The transcription factor Eyes absent is a protein tyrosine phosphatase // *Nature*. 2003. V. 426. P. 299–302.
21. Migliosi V., Flex E., Guida V. et al. Identification of five novel BOR mutations in human EYA1 gene associated with branchio-oto-renal syndrome by a DHPLC-based assay // *Clin. Genet.* 2004. V. 66. P. 478–480. doi 10.1111/j.1399-0004.2004.00318
22. <https://www.thermofisher.com>.
23. Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б. и др. Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) // *Мед. генетика*. 2017. Т. 16. № 7. С. 4–17.
24. Bliznetz E.A., Tverskaya S.M., Zinchenko R.A. et al. Genetic analysis of autosomal recessive osteopetrosis in Chuvashiya: the unique splice site mutation in *TCIRG1* gene spread by the founder effect // *Eur. J. Hum. Genet.* 2009. V. 17. № 5. P. 664–672. doi 10.1038/ejhg.2008.234
25. Chen A., Francis M., Ni L. et al. Phenotypic manifestations of branchio-oto-renal syndrome // *Am. J. Med. Genet.* 1995. V. 58. P. 365–370.
26. Propst E.J., Blaser S., Gordon K.A. et al. Temporal bone findings on computed tomography imaging in branchio-oto-renal syndrome // *Laryngoscope*. 2005. V. 115. P. 1855–1862.
27. Song M.H., Kwon T.J., Kim H.R. et al. Mutational analysis of *EYA1*, *SIX1* and *SIX5* genes and strategies for management of hearing loss in patients with BOR/BO syndrome // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 6. P. e67236. doi 10.1371/journal.pone.0067236
28. Toriello H.V., Cohen M.M., Gorlin R.J. et al. Hereditary Hearing Loss and Its Syndromes. Oxford; N.Y., 2004. 502 p.
29. Unzaki A., Morisada N., Nozu K. et al. Clinically diverse phenotypes and genotypes of patients with branchio-oto-renal syndrome // *J. Hum. Genet.* 2018. V. 63. № 5. P. 647–656. doi 10.1038/s10038-018-0429-8

## Molecular Genetic Causes and Clinical Description of Branchio-Oto-Renal Syndrome

O. L. Mironovich<sup>a, \*</sup>, E. A. Bliznetz<sup>a</sup>, T. G. Markova<sup>b</sup>, N. N. Alekseeva<sup>b</sup>,  
T. I. Golybeva<sup>c</sup>, O. P. Ryzhkova<sup>a</sup>, and A. V. Polyakov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Research Centre for Medical Genetics, Moscow, 115478 Russia

<sup>b</sup>National Research Centre for Audiology and Hearing Rehabilitation, Moscow, 117513 Russia

<sup>c</sup>Severodvinsk's Children's Teaching Hospital, Severodvinsk, 164504 Russia

\*e-mail: mironovich\_333@mail.ru

Branchio-otorenal (BOR) syndrome is an autosomal dominant disease characterized by a combination of hearing impairment with preauricular pits, cervical fistulas or cysts and various renal anomalies. Mutations in the gene *EYA1* are responsible for 40% of cases of BOR syndrome. This work presents for the first time a detailed clinical description and molecular genetic study of the BOR syndrome in the Russian Federation: among eight Russian patients from 4 unrelated families. As a result, two pathogenic variants (c.394C>T (p.Gln132\*), c.519delT (p.Gln174Asnfs\*66), c.1360G>A (p.Gly454Ser)) in the gene *EYA1* were revealed for the first time in the three patients with branchio-otorenal (BOR) syndrome. The pathogenic variant c.858delC (p.Ile286Leufs\*79), first identified in an earlier study, was analyzed. The results obtained in this article demonstrate the significant contribution of the genetic pathology caused by mutations in the *EYA1* gene to the incidence of BOR syndrome in Russian patients. Frequency of occurrence of clinical signs of BOR syndrome in Russian patients corresponds to foreign data.

**Keywords:** branchio-otorenal syndrome (BOR syndrome), gene *EYA1*.