

На правах рукописи

Васильева Татьяна Алексеевна

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
ВРОЖДЕННОЙ АНИРИДИИ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

03.02.07 – Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва, 2018

Работа выполнена в лаборатории генетической эпидемиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр».

Научный руководитель:

Марахонов Андрей Владимирович, кандидат биологических наук

Научный консультант:

Хлебникова Ольга Вадимовна, доктор медицинских наук

Официальные оппоненты:

Ким Александр Иннокентьевич, доктор биологических наук, профессор кафедры генетики Биологического факультета Федерального государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М. В. Ломоносова)

Зольникова Инна Владимировна, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет им А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится _____ на заседании Диссертационного ученого совета Д 001.016.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Медико-генетический научный центр» (115522, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1, www.med-gen.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр» по адресу: 115522, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1.

Ученый секретарь Диссертационного совета Д 001.016.01
по защите диссертаций на соискание ученой
степени кандидата наук, на соискание ученой
степени доктора наук,
доктор медицинских наук, профессор

Зинченко Рена Абульфазовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Врожденные пороки развития (ВПР) органа зрения являются одной из основных причин инвалидности в детском возрасте с малой эффективностью лечения (распространенность не менее 2,7 на 10 000 населения) (Хлебникова, Дадали, 2014). 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 вотягощенных семьях.

Врожденная аниридия (ОМIM #106210) (ВА) — наследственный ВПР с аутосомно-доминантным типом наследования, встречающийся в популяциях, по данным Орфанет, с частотой в среднем 1:57 143 человек. В 75% встречается несиндромальная форма ВА, которая в 80–90% случаев сочетается с аномалиями нескольких структур глаза. В 25% случаев ВА является симптомом различных наследственных синдромов, как моногенных, так и хромосомных (Schanilec and Biernacki, 2014). Синдромальные формы аниридии включают три подтипа: а) синдром WAGR (синдром сочетания опухоли Вильмса, аниридии, мочеполовых аномалий и задержки умственного развития) – около 13%; б) ВА, отягощенную поражением ЦНС, эндокринной, мочеполовой и других органов и систем (около 10%) и в) нетипичные редкие формы врожденной аниридии, возникающие на фоне других сложных моногенных или хромосомных патологий (около 2%) (Kokotas and Petersen, 2010). С 2003 года в России зарегистрировано около 300 случаев врожденной аниридии (неопубликованные данные Межрегиональной общественной организации «Межрегиональный центр помощи больным аниридией „Радужка“»).

Большая часть случаев ВА, как изолированной, так и осложненной, обусловлена мутациями в гене *PAX6* (ОМIM *607108) в гетерозиготном состоянии, в том числе, хромосомными перестройками, вовлекающими локус гена, расположенный в регионе 11p13 (Crolla and van Heyningen, 2002; Robinson et al., 2008). Роль других генов из области делеций в формировании фенотипа ВА пока неизвестна.

Синдром WAGR обусловлен делециями региона 11p13, захватывающими локусы гена *PAX6* и гена *WT1* (ОМIM *607102). WAGR встречается в основном (>95%) в виде спорадических случаев (Robinson et al., 2008). Во всех спорадических случаях ВА до установления генетической причины больной имеет 50%-ный риск развития нефробластомы до 8 года жизни. Высокий риск и злокачественность опухоли почки при синдроме WAGR определяют важность проведения ранней дифференциальной диагностики (Grønskov et al., 2001).

Около 2% случаев ВА ассоциированы с другими моногенными и хромосомными синдромами, более редкими по частоте (Kokotas and Petersen, 2010). Среди них в международной базе данных ОМIM выделено порядка 25 различных синдромов, большинство из которых в сочетании с аниридией описаны единожды. Кроме того,

сходные с вызванной мутациями в гене *PAX6* врожденной аниридией фенотипы могут быть также ассоциированы с мутациями в генах *FOXC1* (OMIM *601090), *PITX2* (OMIM *601542), *PITX3* (OMIM *602669) и других (~3% пациентов) (Ito et al., 2009; Reis and Semina, 2011). Мутации в генах *FOXC1* и *PITX2* обычно ассоциированы с синдромом Аксенфельда-Ригера (OMIM #180500, OMIM #602482) и аномалии Петерса (OMIM #604229). Учитывая схожесть фенотипов, необходимо проводить дифференциальную диагностику аниридии и с этими пороками развития глаза.

Вследствие генетической гетерогенности, клинического полиморфизма, наличия региональных особенностей создание единой системы молекулярно-генетической дифференциальной и подтверждающей диагностики, помогающей клиницистам верифицировать точный диагноз, является актуальным как в России, так и в мире.

В разных работах применяется ряд подходов к определению спектра и частот разных типов мутаций, которые не выявляют существенных отличий между популяциями мира (Robinson et al., 2008; Hingorani et al., 2009; Bobilev et al., 2016). С другой стороны, во многих опубликованных работах количество обследованных пациентов невелико, что не позволяет сделать выводов о спектре. Определение спектра мутаций с учетом региональных особенностей является частью внедрения новых и известных алгоритмов молекулярной диагностики.

Представляется актуальным комплексный генетический анализ ВА на выборке российских пациентов, включающий: изучение межлукусной и внутрилукусной гетерогенности, клинического полиморфизма, гено-фенотипических корреляций, функционального действия мутаций для разработки алгоритма подтверждающей и дифференциальной диагностики с возможностью последующей профилактики ВА.

Степень разработанности проблемы

ВА широко изучается медицинскими генетиками и офтальмологами во всем мире, при этом все еще не решены важные вопросы, связанные с этиопатогенезом и синдромальной природой ВА; выявлением гено-фенотипических корреляций; пополнением баз данных за счет вариантов последовательности гена *PAX6* с неочевидным клиническим значением, требующих функционального подтверждения, а также за счет уникальных делеций 11p13.

В РФ исследований по изучению молекулярно-генетических основ ВА ранее не проводилось. До настоящего времени попытки установить возможные корреляции генотипа и фенотипа не выявили конкретных закономерностей (Yokoi et al., 2016), что, возможно, обусловлено малым размером анализируемых выборок (только в 3 ретроспективных исследованиях размер выборки составил более 50 человек) (Vincent et al., 2003; Robinson et al., 2008; Bobilev et al., 2016).

Еще недавно считалось, что большинство случаев врожденных аниридий относятся к «изолированной классической аниридии» (OMIM AN1, #106210) (Netland et al., 2011). С совершенствованием исследований в области молекулярной генетики и

расширением возможностей клинического обследования пациентов в последнее время любую форму врожденной изолированной аниридии стали считать синдромальной патологией и называть «РАХ6 синдромом» (Käsmann-Kellner and Seitz, 2014). Однако данный термин пока не имеет широкого применения и не используется в практике врачей офтальмологов. Разработанный в 2012 году и применяемый в мире алгоритм ДНК-диагностики ВА учитывает только относительно высокую долю хромосомных перестроек, отсутствие мажорных точковых мутаций в гене *РАХ6* и высокий риск развития опухоли Вильмса в спорадических случаях аниридии. Определение локального спектра мутаций, тем не менее, не теряет своей актуальности для модификации и совершенствования существующего алгоритма диагностики.

Цель работы

Целью исследования является изучение гетерогенности, частоты и спектра мутаций при врожденной аниридии и разработка алгоритма клиничко-генетической диагностики в российской популяции.

Задачи исследования

1. Определить спектр, частоту, типы мутаций гена *РАХ6* у российских больных с врожденной аниридией.
2. Установить спектр и частоту вариаций числа копий региона 11p13 у пациентов с врожденной аниридией и синдромом WAGR.
3. Изучить функциональное действие и подтвердить патогенную роль впервые обнаруженных вариантов нуклеотидной последовательности в гене *РАХ6* с неизвестным клиническим значением.
4. Описать клиничко-генетические особенности и провести анализ гено-фенотипических корреляций в группе российских больных с врожденной аниридией и синдромом WAGR.
5. Разработать алгоритм подтверждающей и дифференциальной молекулярно-генетической диагностики врожденной аниридии для российской популяции.

Методология и методы исследования

Выборка для генетического исследования сформирована из пациентов с клиническим диагнозом ВА и синдрома WAGR, подписавших информированное согласие на участие в исследовании и обработку персональных данных. Проведение данного исследования одобрено этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ». В работе использованы общенаучные эмпирические (наблюдение и описание, эксперимент, сравнение), теоретические (аналогия, анализ, синтез, обобщение, моделирование, индукция, дедукция) и специальные методы (изучение литературных источников, молекулярно-генетические методы, цитогенетические методы, регистрация информации, методы функциональной геномики, биоинформатики и статистического анализа). Особенностью данного анализа является значительная величина выборки пациентов, соответствующей единому временному срезу.

Положения, выносимые на защиту

1. Анализ нуклеотидной последовательности экзонов и фланкирующих их участков интронов гена *PAX6* у 91 пробанда с ВА позволил идентифицировать малые мутации гена *PAX6* в 63,7% случаев. Определен специфический для российских пациентов спектр внутригенных мутаций гена *PAX6* (26 новых – 54,2%, 22 известные мутации – 45,8%), частые нонсенс-мутации в «горячих точках» гена. В результате анализа вариации числа копий региона 11p13 у 33% пробандов определены 17 различных делеций размером от 3 тыс. п. н. до 7,5 млн п. н. Выявлена высокая частота (0,099) делеции 3'-дистантного регуляторного участка 11p13, не затрагивающего кодирующую часть гена *PAX6*.

2. Частота синдрома WAGR составила 0,11. Хромосомные делеции региона 11p13, захватывающие гены *PAX6* и *WT1* (WAGR-область), выявлены в трех группах пациентов: у пробандов с опухолью Вильмса и клиническим диагнозом синдрома WAGR (0,077); у пробандов с ВА без опухоли Вильмса, достигших возраста ее манифестации (0,022); и у пациентов с ВА без опухоли Вильмса, не достигших возраста манифестации (0,033).

3. Анализ клинического значения выявленных вариантов нуклеотидной последовательности установил их патогенный и вероятно патогенный статус согласно критериям ACMG. Проведенный функциональный анализ одного варианта с неизвестным клиническим значением (*PAX6*:c.142-14C>G) подтвердил его патогенное значение за счет влияния на паттерн нормального сплайсинга.

4. Определены фенотипические особенности пациентов с ВА: поражение различных структур глаза установлено в 98% случаев, вовлеченность других органов и систем (ЦНС, ЖКТ, скелета, мочеполовой система и т.д.) – в 44,1%. Тяжелые фенотипы с мультисистемным поражением выявлены в 14,7% случаев ВА и встречаются при разных типах мутаций гена *PAX6*.

5. Установлены корреляции между частотой поражения различных структур глаза у пациентов с ВА, т.е. тяжестью фенотипа и типом генетических повреждений. Фенотипы ВА, ассоциированные с мутациями, приводящими к потере функции (нонсенс-мутации, мутации сдвига рамки считывания), имеют более тяжелое клиническое течение. Более мягкий фенотип наблюдается у пациентов с миссенс-мутациями и делециями 3'-*цис*-регуляторной области гена *PAX6*. Вовлеченность поражения других органов и систем чаще наблюдаются при делециях WAGR-области. Нефробластома развивается чаще у пациентов с делециями WAGR-области, захватывающими локус гена *LMO2*.

6. Разработан алгоритм подтверждающей и дифференциальной молекулярно-генетической диагностики врожденных форм аниридии с учетом особенностей спектра и частот мутаций гена *PAX6* в российской популяции, позволяющий определить генетическую причину заболевания у 97,8% пробандов.

Научная новизна результатов исследования

Впервые определен спектр, частота и типы мутаций гена *PAX6* и региона 11p13 на выборке из 91 пробанда с врожденной аниридией и синдромом WAGR. Выявлено 48 различных внутригенных мутаций гена *PAX6*, из которых 54,2% (26 мутаций) описаны впервые. Установлен их патогенный и вероятно патогенный статус согласно критериям ACMG.

Впервые для варианта нуклеотидной последовательности с неизвестным клиническим значением (*PAX6*:c.142-14C>G), локализованного в глубокой интронной области, проведен функциональный анализ, подтвердивший его патогенную роль за счет влияния на паттерн нормального сплайсинга.

Впервые изучен спектр и частота вариаций числа копий региона 11p13, который определили 17 различных делеций размером от 3 тыс. до 7,5 млн п. о. у 33% пробандов с ВА. Выявлена высокая частота (0,099) делеции 3'-дистантного регуляторного участка 11p13, не затрагивающего кодирующую область гена *PAX6*. Выявлена делеция, ассоциированная со сбалансированной хромосомной перичентрической инверсией хромосомы 11, возникшей *de novo* (0,011).

Впервые на основании проведенного молекулярно-генетического исследования и выявленных делеций определена частота синдрома WAGR в рассматриваемой выборке, которая составила 0,11.

Изучены и определены частота и спектр мутаций в гене *PAX6* у российских больных с врожденной аниридией. Впервые установлены гено-фенотипические корреляции между некоторыми типами мутаций гена *PAX6* и особенностями клинической картины ВА. Установлены гено-фенотипические корреляции между наличием делеций региона 11p13 определенного размера и локализации и клиническими проявлениями синдрома WAGR.

Модифицирован и расширен имеющийся молекулярно-генетический алгоритм подтверждающей и дифференциальной диагностики различных форм врожденной аниридии.

Научно-практическая значимость

На основе определения частоты и спектра мутаций гена *PAX6* и крупных хромосомных перестроек региона 11p13, разработан алгоритм подтверждающей и дифференциальной молекулярно-генетической диагностики ВА и синдрома WAGR с учетом локальных особенностей изменений генотипа в российской популяции.

На основании проведенного исследования определена высокая частота (76%) внутригенных мутаций в пяти экзонах (5 – 9) гена *PAX6*, что предполагает целесообразность первоначального секвенирования этих экзонов.

Определение генетической причины врожденной аниридии позволит дифференцировать ее с синдромом WAGR и другими заболеваниями, а также использовать при прогнозе течения и определения тактики лечения и профилактики на основе выявленных гено-фенотипических корреляций. Своевременно начатый

мониторинг, направленный на ранее выявление опухоли Вильмса у пациентов с делециями WAGR-области значительно повышает качество их жизни.

Все выявленные в данном исследовании мутации гена *PAX6* зарегистрированы в международных базах данных о вариантах нуклеотидной последовательности, ассоциированных с наследственными заболеваниями человека (LOVD, ClinVar).

В связи с высокой частотой (68,13%) единичных случаев ВА необходимо определение возможного соматического мозаицизма по патогенной мутации у родителей, который выявлен в 3,3% случаев. Риск повторного рождения больного ребенка в семье с выявленным соматическим мозаицизмом рассчитывается индивидуально.

Функциональный анализ одного из впервые обнаруженных вариантов интронной последовательности гена *PAX6* позволил подтвердить его патогенную роль, верифицировать диагноз у пациента и показать эффективность использованной системы экспрессии минигена *in vitro*.

Описание клинико-генетических характеристик синдромальных и несиндромальных форм аниридии может быть использовано в практике врачей различных специальностей (офтальмологов, онкологов, генетиков, нефрологов, неврологов и т.д.) и при медико-генетическом консультировании, в т. ч. с целью расчетов риска и пренатальной диагностики семей с отягощенным анамнезом. Результаты работы могут быть внедрены в образовательный процесс.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

В соответствии с областями исследования специальности 03.02.07 – Генетика (биологические науки) — «Генетика человека. Медицинская генетика. Наследственные болезни. Молекулярные основы наследственности. Мутационная изменчивость. Популяционная генетика» — работа включает в себя обсуждение генетики человека, медицинской генетики, наследственных заболеваний.

Степень достоверности и апробация результатов

Основные положения диссертационной работы базируются на материалах первичной документации и полностью им соответствуют. Результаты, полученные автором в процессе комплексного исследования ВА в российских популяциях, свидетельствуют о решении поставленных задач. Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждена верификацией полученных данных на репрезентативной выборке из 117 пациентов (из 91 семьи) с врожденной аниридией. Результаты исследования соответствуют данным, представленным в отечественной и зарубежной литературе. Исследование выполнено при использовании различных методов диагностики (кариотипирование, FISH-анализ, MLPA, секвенирование по Сэнгеру, потеря гетерозиготности и т.д.) и методов статистического анализа. Изложенные в диссертационном исследовании положения, выводы и рекомендации являются достоверными. Для сравнительного анализа привлечено достаточное количество современных источников отечественной и зарубежной литературы (265

источников). Выводы полноценно и объективно отражают результаты проведенных исследований.

Материалы диссертации доложены в 3 устных выступлениях автора и 4 выступлениях соавторов: на 3-й Европейской конференции по аниридии в г. Дуисбург, Германия (26—28 августа 2016 года); на Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные проблемы офтальмологии с вопросами врожденной аниридии» в г. Чебоксары (2-4 июля 2015); на Первой Всероссийской конференции по врожденной аниридии с участием пациентов в г. Москва (2–4 июля 2015); на Съезде медицинских генетиков в г. Санкт-Петербург (19–23 мая 2015 г); на X Всероссийской научной конференции молодых ученых в г. Москва (2015); на Международном симпозиуме по системной биологии и биомедицине в г. Новосибирске (Sbiomed-2016), сентябрь 2016; на Научно-практической конференции по оптометрии, 19 сентября 2017, г. Москва; и в виде тезисов и постерных сообщений на 9 международных конференциях: 2-й Европейской конференции по аниридии в г. Венеция, Италия (19–20 сентября 2014 года); Съезде медицинских генетиков в г. Санкт-Петербург (19–23 мая 2015 г); X Всероссийской научной конференции молодых ученых в г. Москва (2015); II Всероссийской Конференции по молекулярной онкологии с участием ведущих специалистов из России и Европы в г. Москва (6–8 декабря 2016); Международном симпозиуме по системной биологии и биомедицине в г. Новосибирск Sbiomed-2016, (сентябрь 2016); 3-й Европейской конференции по аниридии в г. Дуисбург, Германия (26–28 августа 2016 года); Европейской конференции по генетике человека ESHG 2017 в г. Копенгаген (Дания) (27–30 мая 2017 года); 11-й Европейской Конференции по цитогенетике ECA 2017 в г. Флоренция (Италия) (1–4 июля 2017 года); Совместной конференции Международного общества ретинобластомы и Группы по изучению наследственной патологии органа зрения Соединенного Королевства UKEGG&ISGEDR 2017 в г. Лидс (Великобритания) (14–16 сентября 2017 года).

Работа одобрена этическим комитетом, прошла экспертную комиссию, рекомендована к защите на заседании Диссертационного совета ФБГНУ «МГНЦ».

Личный вклад автора в проведение исследования

Автор работы непосредственно участвовал в разработке дизайна исследования, формулировке целей и задач, выборе методов исследования, статистической обработке полученных данных. Автором настоящей работы был проведен анализ ДНК-образцов всех 117 больных (110 с диагнозом ВА и 7 пациентов с синдромом WAGR), а также их родственников. Последующая обработка полученных данных, включая гено-фенотипические корреляции, проведена автором диссертационного исследования лично. Автор принимал участие в разработке диагностического алгоритма для подтверждающей и дифференциальной диагностики ВА и синдрома WAGR. Автором изучена и проанализирована обширная литература по теме диссертации, сформулированы результаты и выводы. Результаты настоящего исследования

опубликованы автором в рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах, а также представлены на международных научных конференциях.

Публикации

Материалы диссертации представлены в 27 печатных работах, в том числе 11 статьях в журналах, рекомендованных ВАК МОН РФ для соискателей ученой степени кандидата биологических наук и одном патенте РФ на изобретение RUS 2641254 18.08.2017.

Структура и объем диссертации

Диссертация имеет следующую структуру: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, список литературы, 4 приложения. Работа представлена на 148 страницах машинописного текста, содержит 29 таблиц и 9 рисунков. Библиографический указатель включает 265 наименований, из них 5 отечественных и 260 иностранных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Первый раздел обзора посвящен рассмотрению этиопатогенеза и клинической картины ВА: На основании генетической причины все формы ВА разделены на 7 классов: 1). *PAX6*-ассоциированная ВА, 2). ВА, ассоциированная с другими генами, 3). ВА в составе синдрома WAGR, 4). ВА в составе синдрома WAGR в сочетании с другими синдромами частичной моносомии 11p13, 5). ВА в составе очень редких синдромов известной (отличной от локуса 11p13) и 6). неизвестной этиологии. Во втором разделе обзора рассматриваются молекулярно-генетические основы ВА, спектр и механизм действия известных мутаций гена *PAX6*, в третьем – современная стратегия и алгоритм молекулярно-генетической диагностики ВА.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы исследования

Выборка для генетического исследования сформирована на основе клинических диагностических признаков, характеризующих ВА: врожденного отсутствия ткани радужки, в редких случаях – гипоплазии радужки, в сочетании с врожденной гипоплазией фовеа и другими поражениями глаз. От всех обследованных больных или их законных представителей (родителей) получено информированное согласие на участие в исследовании. В исследование включены 117 больных из 91 неродственной семьи: 110 пациентов с предположительным диагнозом врожденная аниридия из 84 неродственных семей и 7 пациентов из 7 семей – с диагнозом синдром WAGR. Более половины (62 человека, 52,9%) случаев представлены единичными больными безотягощенного семейного анамнеза (далее — спорадические случаи ВА). Тип регистрации — единичный отбор (семья регистрировалась через единственного пробанда). Средний возраст пациентов составил $16,9 \pm 16,8$ лет (варьирует от 6 месяцев до 65 лет); большинство больных в выборке ($n=67$ человек – 57,3%) обследованы в

возрасте до 12 лет. Соотношение по полу (мужчины:женщины) составляет 1:1,3. Диагноз поставлен на основе анализа клинической картины в ФГБНУ «МГНЦ» (63 пациентам) и в Чебоксарском филиале ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» (54 пациентам).

Методы

Анализ мутаций в гене *PAX6* включал: двунаправленное прямое автоматическое секвенирование 14 экзонов гена *PAX6*, мультиплексную реакцию лигазозависимой амплификации проб (MLPA) с последующим подтверждающим анализом потери гетерозиготности с помощью исследования сегрегации STR маркеров в семьях.

Для верификации результатов MLPA в случаях выявления хромосомной делеции в коротком плече хромосомы 11 (p13), затрагивающей ген *WT1*, проведена таргетная флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH) с локус-специфичным ДНК-зондом (LSP *WT1*).

Статус патогенности идентифицированных вариантов последовательности установлен на основе использования рекомендаций Американской коллегии медицинской генетики, геномики и ассоциации молекулярной патологии (Richards et al., 2015).

Функциональный эффект изменений в интронной последовательности на сплайсинг проанализирован в лаборатории функциональной геномики ФГБНУ «МГНЦ» по оригинальной методике, включавшей клонирование мутантной последовательности и последовательности дикого типа в эукариотический вектор, предназначенный для детекции изменений в паттерне сплайсинга, последующую трансфекцию в клетки человека линии НЕК293 и анализ продуктов экспрессии гетерологичной конструкции методом ОТ-ПЦР и секвенирования полученных ампликонов.

Для выявления гено-фенотипических корреляций построены таблицы сопряженности 2×2, которые проанализированы с помощью точного критерия Фишера. Для каждого вида мутации данные разделены на две категории двумя разными способами: 1) есть данный тип мутации/нет (есть все остальные мутации или мутация не обнаружена), 2) есть данный признак/нет.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Генетическая гетерогенность ВА

В результате комплексной ДНК-диагностики определены молекулярно-генетические изменения в 98,2% случаев ВА (у 97,8% пробандов), которые представлены: внутригенными мутациями гена *PAX6* – у 58 пробандов (63,7%), крупными хромосомными делециями 11p13 – у 30 пробандов (33,0%), мутациями в других генах (хромосомная делеция локуса гена *FOXC1*) – у 1 пробанда (1,1%). В двух случаях (2,2%) первичную молекулярно-генетическую природу заболевания установить не удалось (см. табл. 1).

Таблица 1. Общее количество обследованных пациентов с диагнозами ВА и WAGR, количество спорадических и семейных случаев и пациентов с идентифицированными делециями 11p13 и внутригенными мутациями в гене *PAX6*

Пробанды	<i>PAX6</i> анализ			Всего изучено пробандов	
	Внутригенные мутации	Делеции (MLPA)	Пробанды без мутации гена <i>PAX6</i>		
WAGR	0	10 (7 подтвержденных и 3 пациентов в возрасте до 1 года с подозрением на синдром WAGR)	0	10	62 спорадических случая
Спорадическая аниридия	35	14	3	52	
Семейная аниридия	23	6	0	29	
Все	58	30	3	91	

В результате секвенирования по Сэнгеру у 58 пробандов с ВА обнаружено 48 различных внутригенных мутаций гена *PAX6*: 26 обнаружены впервые, 22 описаны ранее другими авторами и зарегистрированы в базах данных о мутациях в гене *PAX6*. Тридцать восемь мутаций обнаружено в кодирующей части гена, две – в 5'-UTR и 8 мутаций – в интронах. Установлено значительное разнообразие видов внутригенных мутаций. Идентифицированные у пациентов с ВА мутации гена *PAX6* представлены в табл. 2.

Таблица 2. Идентифицированные малые мутации гена *PAX6*

Мутации сдвига рамки	Нонсенс	Миссенс	Мутации 5'-UTR
c.371delA	c.130C>T	c.140A>G	c.-128-2delA
c.491delC	c.300G>A	c.151G>A	c.-125dupG
c.78delG	c.307C>T	c.357C>G	Изменения старт-кодона
c.109dupG	c.403C>T	c.19G>C	c.+1A>G
c.125_126delTTinsC	c.467G>A	c.164A>C	c.1A>C
c.291_294dup4(CTTT)	c.607C>T	Сплайсинга	Изменение стоп-кодона
c.293_298ddelTTGCTTinsGTTCCA	c.661C>T	c.1183+2T>C	c.1268A>T
c.353delC	c.718C>T	c.133_141+4del13	
c.367_373del7(ATAAACA)	c.781 C>T	c.683-1G>C	
c.401delA	c.794G>A	Интронные варианты	
c.449_453del5(ACGGG)ins7(CCGGAAC)	c.184G>T	c.141+4A>G	
c.760delA	c.244G>T	1032+6T>G	
c.792dupA	c.265C>T	c.142-14C>G	
c.879delC	c.511C>T	c.142-5T>G	
c.1047_1050del4(CCAG)	c.1183G>T	c.682+4delA	

Известные малые мутации гена *PAX6* (n=22) определены у 32 пробандов. Обнаружены 4 часто встречающиеся во всех популяциях рекуррентные нонсенс-

мутации: p.Arg103*, p.Arg203*, p.Arg240*, p.Arg261*. Они определены у 12 неродственных пациентов. Всего повторяющиеся мутации обнаружены у 15 из 91 пробанда (16,5%).

Новые мутации гена *PAX6* (n=26) определены у 26 из 58 пробандов с идентифицированными внутригенными мутациями (44,8%), из них у половины пациентов (13/26, 50%) обнаружены новые мутации сдвига открытой рамки считывания (см. рис. 1). У 76% (44/58) пробандов идентифицированные внутригенные мутации сосредоточены в пяти экзонах гена: 5, 6, 7, 8 и 9, – соответствующих последовательности парного бокса, линкерной области и гомеодомена. Согласно LOVD, в этих экзонах находится около 64% мутаций, обнаруженных в мировой выборке.

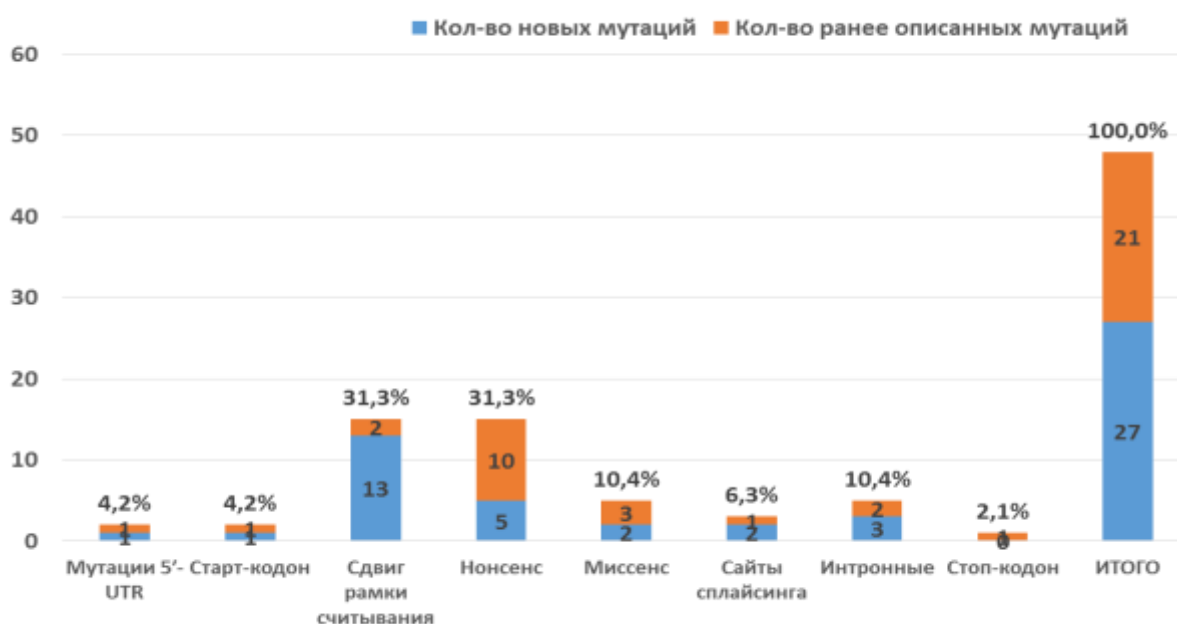


Рисунок 1. Спектр внутригенных мутаций кодирующей последовательности и фланкирующих участков интронов гена *PAX6* у больных ВА в российской популяции, идентифицированных у 63,7% пробандов

Методом MLPA у 30 пробандов выявлено 17 разных делеций (рис. 2) размером от 3 тыс п.о. до 7,4 млн п.н.. Они обозначены как Del1–Del17. Обнаружена частая делеция, не затрагивающая кодирующую последовательность гена *PAX6* – Del8 (рис. 2). Делеция расположена на уровне генов *DCDC1* и *ELP4*, ее длина может варьировать от 350 тыс до 1,5 млн п.о.. Делеция удаляет область важного энхансера транскрипции гена *PAX6* – так называемый регуляторный элемент SIMO (Simola et al., 1983). У одного пациента делеция 11p13 возникла в результате перичентрической инверсии inv11(p13;q13).

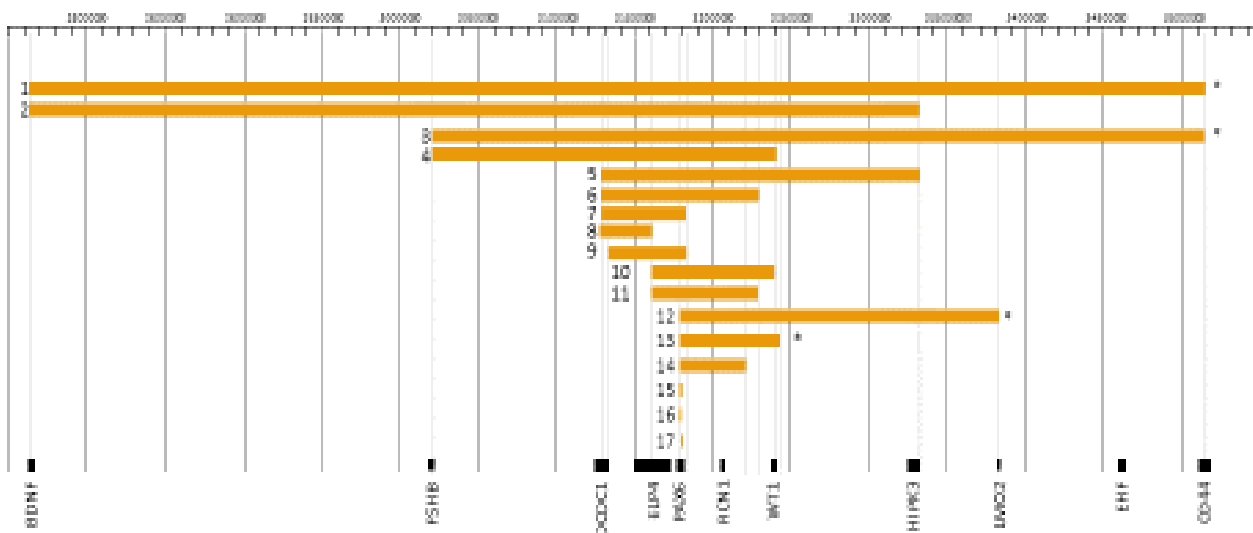


Рисунок 2. Выявленные крупные хромосомные делеции региона 11p13 у пациентов с врожденной аниридией и синдромом WAGR (обозначены «*»).

Так как хромосомные перестройки являются одним из возможных механизмов образования делеций 11p13, а сами делеции служат очень частой причиной ВА (определяются в 1/3 случаев), то исследование сложных хромосомных aberrаций необходимо проводить во всех случаях ВА с идентифицированной делецией. Наличие сбалансированной хромосомной перестройки у здоровых родителей и/или sibсов повышает риск рождения еще одного больного ребенка в отягощенных семьях (с популяционного до, примерно, 11–14%) (Фогель, Мотульски, 1990). Проведение ЛОН анализа (генотипирования по 12 STR маркерам 11p13 семей с делециями) было возможно в 10 семьях. В 7 случаях делеция произошла на аллеле, полученном от отца, в одном – от матери, в двух случаях происхождение делеции не установлено. Анализ потери гетерозиготности, проведенный в двух случаях синдрома WAGR, установил отцовское происхождение аллеля с делецией.

Определен спектр мутаций в гене *PAX6* у российских больных. Соотношение разных типов идентифицированных мутаций приводится на рисунке 3.

У троих пациентов без мутации гена *PAX6* были проанализированы еще нескольких генов, ответственных за регуляцию процессов эмбрионального развития структур переднего отрезка глаза и возникновение перекрывающихся с ВА фенотипов (Sowden, 2007). У одного из пациентов обнаружена хромосомная делеция в сегменте бр25 на уровне гена *FOXC1*. Подобные делеции области бр25 и внутригенные мутации в гене *FOXC1* обнаруживают у пациентов с аномалией Аксенфельда-Ригера типа 3 (OMIM #602482).

Хотя полученный спектр по типам мутаций достоверно не отличался от других групп, установлены его особенности для выборки больных с ВА из России: горячие точки, экзоны с наибольшим количеством выявляемых мутаций, высокая частота хромосомных делеций, а среди них делеций 3'-*цис*-регуляторной области гена *PAX6*.



Рисунок 3. Соотношение разных типов мутаций, выявленных у 91 пробанда.

Фенотипическая гетерогенность ВА

При офтальмологическом обследовании полное/почти полное отсутствие ткани радужки установлено у 87 из 117 пациентов (74,4%), у 30 (25,6%) отмечалось наличие различного объема радужной оболочки от частичной аниридии до колобомоподобных дефектов радужки, у двоих пациентов изменения в радужке были представлены ее гипоплазией и выворотом пигментной каймы. У большинства пациентов (98%) определены дополнительные поражения других структур глаза с симметричной манифестацией на обоих глазах. Сто два пациента с ВА были осмотрены на предмет наличия нарушений других органов и систем. У 45 из 102 (44,1%) пациентов с ВА обнаружена различная соматическая патология, включающая в 21,6% (22/102) – изменения, затрагивающие центральную нервную систему. Тяжелые комплексные фенотипы, характеризующиеся значительными нарушениями различных органов и систем, встречены у 15 из 102 обследованных пациентов с ВА (в 14,7% случаев).

Гено-фенотипические корреляции

Генетические причины врожденной аниридии разделены на 6 групп: нонсенс-мутации (n=29 пациентов), миссенс-мутации (n=6), мутации сайтов сплайсинга и интронные варианты (n=14), нарушающие сплайсинг, небольшие инсерции и/или делеции, приводящие к сдвигу открытой рамки считывания (n=19), 2 группы крупных хромосомных перестроек: затрагивающие регион 11p13 без учета делеций 3'-*цис*-регуляторной области гена *PAX6* (n=11) и хромосомные делеции региона 11p13, затрагивающие только 3'-*цис*-регуляторную область (n=13). Выделено 6 характерных клинических признаков ВА: наличие полной или частичной аниридии, нистагма, кератопатии 1-3 стадии, катаракты (без разделения на врожденную и осложненную),

глаукомы (также без разделения на врожденную и осложненную) и гипоплазии центральной ямки сетчатки.

Для поиска взаимосвязи между характерными фенотипическими признаками, часто встречающимися у пациентов с ВА, и обнаруженными мутациями были построены таблицы сопряженности 2×2, которые проанализированы с помощью точного критерия Фишера (табл. 3).

Таблица 3. Значения вероятностей точного критерия Фишера для таблиц сопряженности фенотипических признаков и идентифицированных мутаций

Тип мутации	Нонсенс	Миссенс	Сплайсинга	Сдвига рамки	Делеции (без 3')	Делеции 3'- <i>цис</i> -регуляторной области
Клинический признак						
Полная/частичная аниридия	<u>0,0029</u>	<u>0,0217</u>	0,0780	1	0,7063	1
Нистагм	1	1	1	1	0,0528	<u>0,0402</u>
Кератопатия	<u>0,0406</u>	0,6938	0,5626	0,2725	1	<u>0,0004</u>
Катаракта	0,0875	0,0683	1	<u>0,0360</u>	1	0,2401
Глаукома	0,8113	0,6597	1	<u>0,0249</u>	0,7213	<u>0,0077</u>
Гипоплазия фовеа	0,0794	0,2037	0,0612	0,7238	0,6759	<u>0,0007</u>
Вовлеченность в поражение других органов и систем	0,6556	0,3954	0,4153	0,5784	0,3083	0,2271

Более мягкий фенотип достоверно чаще наблюдается у пациентов с делециями 3'-*цис*-регуляторной области гена *PAX6*. Для него характерно отсутствие нистагма, кератопатии, гипоплазии фовеа ($p=0,0402$, $p=0,0077$, $p=0,0007$, соответственно). Вовлеченность в поражение других органов и систем встречается одинаково часто при любых видах мутаций ($p>0,05$).

Исследовано также влияние положения делеции на хромосоме на развитие признаков синдрома WAGR у пациентов с делециями WAGR-области (рис. 4). Неожиданным оказался тот факт, что захваченность только гена *WT1* не может объяснить развитие опухоли. По нашим данным нефробластома развивалась достоверно чаще у пациентов с расширением проксимальной границы делеции в сторону центромеры (двусторонний точный критерий Фишера, $p=0,0151$). Вероятно, вклад в повышение риска развития нефробластомы вносят расположенные в области делеции гены, действующие в качестве супрессоров опухолевого роста и ассоциированные с канцерогенезом. В роли таких генов могут выступать *EIF3M* (11p13 OMIM*609641) и *LMO2* (11p13 OMIM*180385).

Пациенты	Возраст	11p13											Фенотип	Клинические признаки				
		тел				цен								Пораж.	ЦНС	Нефро- бластома		
		BDNF	FSHB	DCDC1	ELP4	PAX6	RCN1	WT1	HPK3	LMO2	EHF	CD44						
07.17	41				■	■	■	■	■					BA	-		-	
20.03	1		■	■	■	■	■	■						WAGR?+Др	+		-	
A-32	13					■	■	■						WAGR	+		+	
A-30	5	■	■	■	■	■	■	■						BA+Др	+		-	
A-43	1	■	■	■	■	■	■	■						WAGR?+Др	+		-	
33.03	1			■	■	■	■	■						WAGR?+Др	+		-	
A-48	18					■	■	■		■				WAGR	+		+	■
A-50	18		■	■	■	■	■	■		■	■			WAGR	+		+	■
AN52	2	■	■	■	■	■	■	■		■	■			WAGR	+		+	■
07.03	3	■	■	■	■	■	■	■		■	■			WAGR	+		+	■
A-21	4	■	■	■	■	■	■	■		■	■			WAGR	+		+	■
A-10	3	■	■	■	■	■	■	■		■	■			WAGR	+		+	■

Рисунок 4. Локализация дистальной и проксимальной границ делеций WAGR-области и соответствующие этим делециям фенотипы

Алгоритм диагностики

Разработан алгоритм комплексной подтверждающей и дифференциальной ДНК-диагностики ВА и синдрома WAGR, который состоит из трех основных последовательных этапов: 1). анализа вариации числа копий региона 11p13 методом мультиплексной реакции лигазависимой амплификации зондов (MLPA анализа) и валидации обнаруженных делеций; 2). определения точковых изменений гена *PAX6* методом прямого секвенирования по Сэнгеру с подтверждением патогенного характера найденных мутаций и 3). анализа генов *FOXC1*, *CYP11B1*, *PITX2* (анализа количества копий генов и секвенирование по Сэнгеру) у пациентов с необнаруженными мутациями гена *PAX6* или делециями региона 11p13.

4. ВЫВОДЫ

1. В результате анализа нуклеотидной последовательности экзонов и фланкирующих их участков интронов гена *PAX6* у 91 пробанда с ВА молекулярно-генетическая причина идентифицирована у 58 (63,7%). Выявлено 48 различных внутригенных мутаций гена *PAX6*: 26 новых (54,2%) и 22 (45,8%) ранее описанные. Определены «мажорные» мутации: p.Arg240* (частота 0,055; n=5), p.Arg203* (0,044;

n=4), с.1183+2T>C (0,022; n=2), и p.Arg103* (0,022; n=2), p.Gln89* (0,022; n=2), встречающиеся в разных популяциях мира. Спектр по типам мутаций соответствует литературным данным ($p=0,4877$ и $p=0,1698$).

2. Изучен спектр и частота вариаций числа копий региона 11p13: определены 17 различных делеций размером от 3 тыс. до 7,5 млн п. о. у 30 пробандов (33%), что соответствует литературным данным ($p>0,05$). Определена высокая частота (0,099) делеции 3'-дистантного регуляторного участка 11p13, не затрагивающего кодирующую область гена *PAX6*. Выявлена делеция, ассоциированная со сбалансированной хромосомной перичентрической инверсией хромосомы 11, возникшей *de novo* (0,011).

3. Крупные хромосомные делеции региона 11p13, захватывающие гены *PAX6* и *WT1* (WAGR-область), выявлены в трех группах пациентов: у пробандов с опухолью Вильмса и клиническим диагнозом синдрома WAGR (0,077); у пробандов с ВА без опухоли Вильмса, достигших возраста ее манифестации (0,022); у пациентов с ВА без опухоли Вильмса, не достигших возраста манифестации (0,033). Частота синдрома WAGR составляет (0,110), что соответствует литературным данным ($p=0,5256$, $p=0,4513$, $p=0,1655$).

4. Анализ клинического значения выявленных мутаций установил их патогенный и вероятно патогенный статус согласно критериям ACMG. Для обнаруженного впервые варианта нуклеотидной последовательности с неизвестным клиническим значением *PAX6*: с.142-14C>G, локализованного в глубокой интронной области, проведен функциональный анализ, подтвердивший его патогенную роль за счет влияния на паттерн нормального сплайсинга.

5. Изучены фенотипические особенности пациентов с ВА: поражение различных структур глаза определено в 98% случаев и вовлеченность других органов и систем (ЦНС, ЖКТ, скелета, мочевой системы и т.д.) – в 44,1%. Крайне тяжелые фенотипы, с мультисистемным поражением выявлены в 14,7% случаев с ВА (n=15/102 пациентов), ассоциированы с разными типами мутаций гена *PAX6*.

6. Проведенный анализ гено-фенотипических корреляций определил ряд закономерностей. Фенотипы ВА, ассоциированные с мутациями, приводящими к потере функции, имеют более тяжелое клиническое течение: при нонсенс-мутациях чаще встречается полная аниридия ($p=0,0029$) и кератопатия ($p=0,0406$), при мутациях сдвига рамки считывания чаще развивается катаракта ($p=0,0359$) и глаукома ($p=0,0249$). Миссенс-мутации ассоциированы с частичной аниридией ($p=0,0218$). Более мягкий фенотип наблюдается у пациентов с делециями 3'-*цис*-регуляторной области гена *PAX6* – реже развивается нистагм ($p=0,0402$), кератопатия ($p=0,0077$) и гипоплазия фовеа ($p=0,0007$). При делециях WAGR-области чаще наблюдаются поражения других органов и систем ($p=0,0409$). Нефробластома развивается чаще ($p=0,0152$) у пациентов с делециями WAGR-области, захватывающими локус гена *LMO2*.

7. Разработан алгоритм подтверждающей и дифференциальной молекулярно-генетической диагностики врожденных форм аниридии с учетом особенностей спектра и частот мутаций гена *PAX6* в российской популяции. Применение данного алгоритма позволяет выявить генетическую причину заболевания у 97,8% пробандов.

Практические рекомендации

1. Проведенное исследование позволило скорректировать имеющийся алгоритм подтверждающей и дифференциальной молекулярно-генетической диагностики врожденных форм аниридии в российской популяции, включающий последовательные этапы: MLPA, секвенирование гена *PAX6* и подтверждение статуса патогенности согласно критериям ACMG (после анализа популяционной частоты варианта, косегрегации фенотипа и мутации, *in silico* предсказания и – при необходимости – функционального анализа), стандартное цитогенетическое исследование и FISH (по показаниям).

2. В случае обнаружения делеций WAGR-области проводится таргетная FISH с локус-специфичными ДНК-зондами к региону 11p13 и стандартное цитогенетическое исследование для выявления структурных хромосомных аномалий. В случае обнаружения других делеций проводится стандартное цитогенетическое исследование и анализ потери гетерозиготности по локусам высокополиморфных STR маркеров в семьях пробандов.

4. Выявление делеции WAGR-области у пациентов с ВА без опухоли Вильмса в доклинической стадии синдрома WAGR требует УЗИ-мониторинга возможного развития опухоли Вильмса до достижения возраста 8 лет.

5. Учитывая высокую частоту (76%) внутригенных мутаций в пяти экзонах (5–9) гена *PAX6* секвенирование следует начинать с этих экзонов.

6. Определение у пациентов с ВА вариантов нуклеотидной последовательности гена *PAX6* с неизвестным клиническим значением (особенно в интронной зоне) требует проведения анализа их функциональной значимости. Для функционального анализа влияния на сплайсинг пре-мРНК может быть использована система экспрессии минигена в модельной клеточной линии, испытанная при проведении данного исследования.

7. Из-за высокой частоты мутаций гена *PAX6 de novo* (68,13%) и встречающегося соматического мозаицизма (3,3%) по патогенной мутации очень важную роль играет внимательное изучение семейной истории, дополнительное клиническое обследование родителей (наличие гипоплазии или дисплазии радужки) и выяснение их генетического статуса (включая анализ буккального эпителия и мочи), от которого зависит риск повторного рождения больного ребенка в семье. Риск повторного рождения больного ребенка в семье рассчитывается индивидуально, с учетом родословной и процента мозаичных клеток.

8. Учитывая возможность поражения других органов и систем, пациентам с ВА во всех случаях требуется полное клинико-лабораторное обследование.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендуемых ВАК МОН РФ:

1. **Васильева Т.А.**, Поздеева Н.А., Воскресенская А.А., Хлебникова О.В., Зинченко Р.А., Гинтер Е.К. Генетические аспекты врожденной аниридии. Литературный обзор // **Практическая медицина**. 2015. №2(87). С.7–13.
2. Воскресенская А.А., Поздеева Н.А., Хлебникова О.В., **Васильева Т.А.**, Зинченко Р.А. Клинические аспекты врожденной аниридии в России // **Практическая медицина**. 2015. №2(87). С.26–33.
3. **Васильева Т.А.**, Хлебникова О.В., Марахонов А.В., Воскресенская А.А., Поздеева Н.А., Зинченко Р.А. Изучение генетических основ и разработка протоколов для диагностики наследственных заболеваний органа зрения на примере врожденной аниридии // **Медицинская генетика**. 2016. Т. 15. №.6. С.37–43.
4. **Vasilyeva, T.A.**, Voskresenskaya, A.A., Käsmann-Kellner, B., Khlebnikova, O. V., Pozdeyeva, N.A., Bayazutdinova, G.M., Kutsev, S.I., Ginter, E.K., Semina, E.V., Marakhonov, A.V. and Zinchenko, R.A. Molecular Analysis of Patients with Aniridia in Russian Federation Broadens the Spectrum of PAX6 Mutations. **Clinical Genetics**. 2017. 92(6). P.639–644. DOI: 10.1111/cge.13019
5. Воскресенская А.А., Поздеева Н.А., **Васильева Т.А.**, Хлебникова О.В., Зинченко Р.А. Клинические особенности врожденной аниридии в детском возрасте // **Российская педиатрическая офтальмология**. 2016. Т.11. №3. С.121–129 DOI: 10.18821/1993-1859-2016-11-3-121-129
6. Voskresenskaya A, Pozdeyeva N, **Vasilyeva T**, Batkov Y, Shipunov A, Gagloev B, Zinchenko R. Clinical and morphological manifestations of aniridia-associated keratopathy on anterior segment optical coherence tomography and in vivo confocal microscopy. // **Ocular Surface**. 2017. V.15. №4. P.759–769. DOI: 10.1016/j.jtos.2017.07.001.
7. Воскресенская А.А., **Васильева Т.А.**, Поздеева Н.А., Зинченко Р.А. Диагностические возможности оптической когерентной томографии и лазерной сканирующей конфокальной микроскопии в изучении проявлений аниридийной кератопатии // **Вестник офтальмологии**. 2017. Т.133. № 6. С. 30–44
8. **Васильева Т.А.**, Воскресенская А.А., Хлебникова О.В., Поздеева Н.А., Марахонов А.В., Зинченко Р.А. Дифференциальная диагностика наследственных форм врожденной аниридии с позиций современной генетики // **Вестник Российской академии медицинских наук**. 2017. Т.72. № 4. С.233–241.
9. Воскресенская А.А., Поздеева Н.А., **Васильева Т.А.**, Зинченко Р.А. Аниридийная кератопатия // **Практическая медицина**. 2017. Т.1. № 9 (110). С.139–143.
10. **Васильева Т.А.**, Воскресенская А.А., Кадышев В.В., Поздеева Н.А., Марахонов А.В., Зинченко Р.А. Клинико-молекулярно-генетические особенности врожденной аниридии // **РМЖ. Клиническая офтальмология**. 2018. № 1. С.7–12. DOI: 10.21689/2311-7729-2018-18-1-7-12.

11. Филатова А.Ю., **Васильева Т.А.**, Скоблов М.Ю., Кадышев В.В., Воскресенская А.А., Марахонов А.В., Зинченко Р.А. Функциональное подтверждение патогенности варианта интронной последовательности гена *PAX6* // **Медицинская генетика**. 2018. Т. 17. № 4. С.42–46. DOI: 10.24110/0031-403X-2018-97-2-94-98
12. Марахонов А.В., **Васильева Т.А.**, Куцев С.И., Зинченко Р.А., Кадышев В.В. Способ дифференциальной и подтверждающей молекулярно-генетической диагностики врожденной аниридии и WAGR–синдрома // **Патент на изобретение RUS 2641254 18.08.2017**.

Публикации в других изданиях:

13. Хлебникова О.В., **Васильева Т.А.**, Поздеева Н.А., Воскресенская А.А., Петрова Н.В., Зинченко Р.А., Гинтер Е.К. Клинико-генетическая характеристика врожденной изолированной аниридии в России //Материалы VII съезда Российского общества медицинских генетиков. г. Санкт-Петербурге 19-23 мая 2015 / Медицинская генетика. 2015. Т.14.– № 4(154). С.34–35.
14. Воскресенская А.А., **Васильева Т.А.**, Хлебникова О.В., Поздеева Н.А., Марахонов А.В., Зинченко Р.А. Анализ клинического случая семейной врожденной аниридии, ассоциированного с вариантом интронной последовательности гена *PAX6* // X Всероссийская научная конференция молодых ученых «Актуальные проблемы офтальмологии», Москва, 2015 / Современные технологии в офтальмологии. 2015. Выпуск № 3(7). С.43–48.
15. Марахонов А.В., **Васильева Т.А.**, Хлебникова О.В., Воскресенская А.А., Поздеева Н.А., Крынская И.А., Козлова Ю.О., Шилова Н.В., Зинченко Р.А. Микроделеция локуса гена *WT1* резко повышает риск развития опухоли Вильмса у пациентов с врожденной аниридией // II Всероссийская конференция по молекулярной онкологии, Москва 2-6 декабря 2016 / Успехи молекулярной онкологии. 2016. Т.3. № 4. С.122–123.
16. Skoblov M.Yu., Zernov N.V., Marakhonov A.V., Shimomura Y., Konovalov F.A., Abrukova A.V., Filatova A.Yu., **Vasilyeva T.A.**, Zinchenko R.A. Functional Analysis of Mutations Revealed by NGS Diagnostics // The International Symposium Systems Biology And Biomedicine (Sbiomed-2016) Novosibirsk, Russia, August 30-31, 2016 / Abstracts. P.99.
17. **Vasilyeva T.A.**, Filatova A.Yu., Voskresenskaya A.A., Khlebnikova O.V., Pozdeyeva N.A., Käsman-Kellner B., Skoblov M.Yu., Marakhonov A.V., Zinchenko R.A. The mutation spectrum and functional analysis identified novel *PAX6* intronic variants in Russian aniridia patients // The 3rd European Aniridia Conference 2016 Duisburg, Germany, 26th-28th Aug 2016 / Abstract Booklet. P.15.
18. Zinchenko R.A., **Vasilyeva T.A.**, Voskresenskaya A.A., Khlebnikova O.V., Pozdeyeva N.A., Kozlova Y.O., Shilova N.V., Marakhonov A.V.. WAGR region deletions size and position do mean // 11th European Cytogenetics Conference 2017, Florence, Italy, 1-7, July 2017 / Molecular Cytogenetics 2017, 10 (Suppl 1):2.P1. P. 38.

19. **Vasilyeva T.A.**, Voskresenskaya A.A., Khlebnikova O.V., Konovalov F.A., Pozdeyeva N.A., Kadyshev V.V., Zinchenko R.A., Marakhonov A.V. Anterior segment dysgenesis with microphthalmia, microcornea and spontaneously reabsorbed cataract is associated with a novel mutation in *CRYAA* // European Society of Human Genetics Conference 2017, Copenhagen, Danmark, May 27–30, 2017 / P02.30B.
20. **Vasilyeva T.A.**, Voskresenskaya A.A., Kadyshev V.V., Pozdeyeva N.A., Khlebnikova O.V., Zinchenko R.A., Marakhonov A.V. A recurrent character and a high frequency of 11p13 deletion affecting *PAX6* downstream regulatory regions in aniridia patients from Russia // Bi-Annual Joint Meeting of the International Society for Genetic Eye Diseases & Retinoblastoma and the UK Eye Genetics Leeds, United Kingdom September 14–16, 2017 / P.71–72.
21. Skoblov M.Y., Filatova A.Y., Vyahireva Y.V., **Vasilyeva T.A.**, Marakhonov A.V., Zinchenko R.A., Rogozhina Y.A, Polyak M., Zaklyazminskaya E.V., Orlova A., Pomerantseva E. Functional analysis of splicing-affecting genomic variants in hereditary diseases // European Society of Human Genetics Conference 2017, Copenhagen, Danmark, May 27–30, 2017 / P13.35C.
22. Кадышев В.В., **Васильева Т.А.**, Зинченко Р.А., Коновалов Ф.А., Воскресенская А.А., Хлебникова О.В., Марахонов А.В. Изменения в гене *CRYAA* при врожденной катаракте с микрофтальмом и микрокорнеа // XVI Всероссийская школа офтальмолога 2017, Москва, 16–19 марта 2017 / В книге: Сборник научных трудов под ред. проф. Е.А. Егорова. С.160.
23. **Васильева Т.А.**, Хлебникова О.В., Марахонов А.В., Петрова Н.В., Воскресенская А.А., Поздеева Н.А., Крынская И.А., Козлова Ю.О., Ряднинская Н.В., Чухрова А.Л., Шилова Н.В., Кадышев В.В., Зинченко Р.А. Молекулярная и цитогенетическая диагностика врожденных форм аниридии // IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием Молекулярная диагностика 2017, Москва, 18–20 апреля, 2017 / В сборнике трудов. С.439–440.
24. Кадышев В.В., Марахонов А.В., **Васильева Т.А.**, Зинченко Р.А. Вклад медицинской генетики в офтальмологию // Научная конференция по детской офтальмологии и оптометрии «Kids Vision» в рамках международной оптической выставки MIOF 2017, Москва, 19 сентября 2017. / Технологии. №2(10). С.21.
25. Марахонов А.В., **Васильева Т.А.**, Кадышев В.В., Шилова Н.В., Воскресенская А.А., Поздеева Н.А., Генинг Г.Н., Зинченко Р.А. Молекулярно-генетическое изучение врожденной аниридии // Научная конференция по детской офтальмологии и оптометрии «Kids Vision» в рамках международной оптической выставки MIOF 2017, Москва, 19 сентября 2017. / Технологии. №2(10). С.23–24.
26. **Vasilyeva, T. A.**, Khlebnikova, O. V., Pozdeyeva, N. A., Voskresenskaya, A. A., Zinchenko, R.A. Novel large deletions of the *PAX6* gene in aniridia patients from Russia. 2nd European Conference on Aniridia Venice, Italy, September 19th–20th, 2014. P.19.

27. **Vasilyeva T.A.**, Zinchenko R.A., Khlebnikova O.V., Pozdeeva N.A., Voskresenskaya A.A., Petrova N.V., Ginter E.K. Mutation analysis of the *PAX6* gene in congenital isolated aniridia patients from Russia // European Society of Human Genetics Conference 2015, Glasgow, Scotland, United Kingdom, June 6–9, 2015 / Eur.J.Hum.Genet, V.23, Supple.1. Abstracts. (J 02.06). P.381.

Список сокращений

ВА – врожденная аниридия

ВПР – врожденные пороки развития

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ОТ-ПЦР – метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией

cen – центромера

ЦНС – центральная нервная система

ClinVar – база данных о вариантах нуклеотидной последовательности человека и ассоциированных фенотипах

FISH – **F**luorescent **I**n **S**itu **H**ybridization – метод флуоресцентной *in situ* гибридизации

HGMDB – Human Gene Mutation Database – база данных обо всех опубликованных вариантах нуклеотидной последовательности, ответственных за наследственные заболевания человека, курируется Институтом Медицинской Генетике в г. Кардиффе (Великобритания)

HEK293 – Human Embryonic Kidney – клеточная линия человеческой эмбриональной почки

LOH – **L**oss-**O**f-**H**eterozygosity – анализ участков потери гетерозиготности

LOVD – **L**eiden **O**pen **V**ariation **D**atabase – Открытая Лейденская база данных о мутациях человека

LSP – **L**ocus **S**pecific **P**robe – локус-специфичный ДНК-зонд для проведения гибридизации

MLPA – **M**ultiplex **L**igation-dependent **P**robe **A**mplification – анализ на основе мультиплексной реакции лигаза-зависимой амплификации проб

OMIM – **O**nline **M**endelian **I**nheritance in **M**an – база данных менделирующих заболеваний человека

STR – Short tandem repeat (короткие tandemные повторы)

tel – теломера

5'-UTR – 5'-нетранслируемая область

3'-UTR – 3'-нетранслируемая область

WAGR – Syndrome WAGR: **W**ilms tumor, **A**niridia, **G**enitourinary anomalies and mental **R**etardation) – синдром сочетания врожденной аниридии с опухолью Вильмса, мочеполовыми аномалиями и задержкой психо-моторного развития